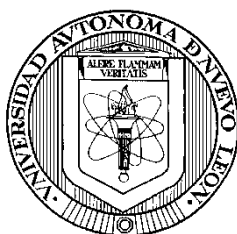


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EVALUACIÓN DEL EXOPOLISÁCARIDO PRODUCIDO POR UNA BACTERIA
PSICROTOLERANTE AISLADA DEL NORESTE DE MÉXICO Y SUS
POTENCIALES APLICACIONES INDUSTRIALES

Por

Q.F.B. VERÓNICA ALVARADO MARTÍNEZ

Como requisito para obtener el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Octubre, 2015.

EVALUACIÓN DEL EXOPOLISACÁRIDO PRODUCIDO POR UNA BACTERIA
PSICROTOLERANTE AISLADA DEL NORESTE DE MÉXICO Y SUS
POTENCIALES APLICACIONES INDUSTRIALES

Revisión de la tesis:

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
ASESOR

Dra. Ma. Teresa Garza González
COMITÉ TUTORIAL

Dr. José Rubén Morones Ramírez
COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
COMITÉ TUTORIAL

A Dios, a la vida y mi familia.

Agradecimientos

Agradezco la oportunidad de poder realizar este sueño profesional principalmente a la vida, por llevarme por el camino indicado.

A mi familia por el eterno cariño y apoyo que siempre me han brindado, especialmente a mi mamá, por sus consejos que me impulsan a buscar siempre la superación profesional y personal, te adoro mami.

Gracias a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindarme la oportunidad de formar parte de sus estudiantes de posgrado y el financiamiento del proyecto, así como también a Conacyt.

Al Dr. Edgar Allan Blanco Gámez, por darme el privilegio de ser su primer estudiante de maestría y todas las recomendaciones brindadas durante este tiempo que me ayudaron inmensamente para poder culminar el proyecto.

Gracias a mis compañeras Nely Menchaca y Olga Flores, por todos esos días de convivencia, las pláticas a la hora de la comida, consejos y sugerencias, fueron unas excelentes compañeras de generación, las extrañaré mucho.

A todos los estudiantes de servicio social y apoyo de investigación que un momento trabajaron conmigo en el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología, por las historias, convivencias y apoyo brindado durante el tiempo que estuve trabajando en el laboratorio.

A mis amigas, Ale, Mayra y Marylú, que aunque están lejos, siempre me mandaban su buena vibra y ánimos para seguir adelante, siguen siendo una parte importante en mi vida.

A todos aquellos que directa o indirectamente aportaron ideas al proyecto, principalmente a mi Comité tutorial por las sugerencias y críticas constructivas con el fin de obtener resultados satisfactorios del proyecto.

A todos los Doctores y compañeros pertenecientes al programa de la Maestría de Microbiología Aplicada, ya que cada uno posee cualidades y conocimientos de los cuales siempre se aprende.

A todos aquellos que a largo de estos años me instruido profesional y personalmente, **¡infinitas gracias!**

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
ABREVIATURAS.....	11
EQUIPOS Y REACTIVOS	12
REACTIVOS	12
EQUIPOS	13
RESUMEN.....	14
CAPÍTULO I.....	15
INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Bacterias Psicotolerantes	15
1.2 Exopolisacáridos microbianos.....	23
1.2.1 Localización y composición de exopolisacáridos microbianos	23
1.2.2 Biosíntesis de exopolisacáridos microbianos	26
1.2.3 Aplicaciones de exopolisacáridos microbianos	30
1.3 Justificación.....	34
Justificación	34
CAPÍTULO II	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
2.1 Hipótesis	35
2.2 Objetivo general	35
2.3 Objetivos específicos	36
CAPÍTULO III	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Crecimiento de cultivos microbianos.....	37
3.1.1 Selección de cepas productoras de EPS por el Método de Rojo Congo	38
3.1.2 Crecimiento de cepas para cuantificar EPS	39
3.2 Extracción de exopolisacárido	41
3.3 Experimentos previos a la optimización de producción de exopolisacáridos	42
3.3.1 Variación en la fuente de nitrógeno	43
3.3.2 Variación en la concentración de fuente de carbono.....	44

3.3.3 Variación de presencia/ausencia de fosfato de sodio monobásico	45
3.4 Método de purificación de exopolisacárido	46
3.5 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford para realizar curva de crecimiento	49
3.6 Diseño de experimentos para la optimización de la producción de exopolisacárido empleando una fuente de carbono alternativa (salvado de trigo)	50
3.7 Técnicas instrumentales y análisis para la caracterización del exopolisacárido	51
3.7.1 Cromatografía en capa fina (TLC)	51
3.7.2 Cuantificación de azúcares reductores por el método ácido 3,5-dinitrosalicílico	52
3.7.3 Cuantificación de proteínas	54
3.7.4 Determinación del contenido de ácidos urónicos	55
3.7.5 Análisis del exopolisacárido por FT-IR	56
3.7.6 Análisis del exopolisacárido por RMN	57
3.8 Estudio de los efectos del exopolisacárido	57
3.8.1 Efecto de crioprotección	57
3.8.2 Efecto de actividad antioxidante	59
3.8.3 Efecto antimicrobiano	61
3.9 Caracterización de la bacteria psicrotolerante productora de exopolisacárido	62
3.10 Manejo y disposición de residuos	62
 CAPÍTULO IV	 63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4.1 Selección de cepas productoras de exopolisacáridos por el método de Rojo Congo	63
4.2 Experimentos previos a la optimización de producción de exopolisacárido	65
4.2.1 Variación de la fuente de nitrógeno	65
4.2.2 Variación de la fuente de carbono	68
4.2.3 Variación de presencia/ausencia de fosfato de sodio monobásico	71
4.3 Curva de crecimiento y producción de EPS	77
4.4 Diseño de experimentos para la optimización de la producción de EPS con una fuente de carbono alternativa	79
4.5 Cromatografía en capa fina (TLC)	86
4.6 Análisis colorimétricos	88
4.7 Análisis del exopolisacárido por FT-IR	90
4.8 Análisis del exopolisacárido por RMN	92
4.9 Estudio de los efectos del exopolisacárido	97
4.9.1 Efecto de crioprotección	97
4.9.2 Efecto de actividad antioxidante	103
4.9.3 Efecto antimicrobiano	104
4.10 Identificación de la bacteria psicrotolerante productora de exopolisacárido	105
 CAPÍTULO V	 111
CONCLUSIONES	111
 CAPÍTULO VI	 114
PERSPECTIVAS	114

CAPÍTULO VII.....	115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Método de extracción de EPS.	42
Fig. 2 Método de purificación de EPS.	48
Fig. 3 Esquema del efecto de crioprotección.	59
Fig. 4 Crecimiento de colonias de bacterias psicotolerantes por el método Rojo Congo.	64
Fig. 5 Producción de EPS con la adición de peptona de caseína como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.	66
Fig. 6 Producción de EPS con la adición de extracto de levadura como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.	66
Fig. 7 Producción de EPS con una concentración de 20 g/L de glucosa en el medio de cultivo.	69
Fig. 8 Producción de EPS con una concentración de 40 g/L de glucosa en el medio de cultivo.	70
Fig. 9 Producción de EPS en ausencia de fosfato de sodio monobásico en el medio de cultivo.	72
Fig. 10 Producción de EPS con presencia de fosfato de sodio monobásico (50 mM) en el medio de cultivo.	72
Fig. 11 Cuantificación de proteínas con presencia de fosfato de sodio monobásico en el medio de cultivo.	75
Fig. 12 Crecimiento microbiano de las cepas KLGC-01 y KLGC-03.	77
Fig. 13 Producción de EPS de las cepas KLGC-01 y KLGC-03.	78
Fig. 14 Gráfica de superficie de respuesta de fuente de carbono vs concentración del extracto de levadura.	84
Fig. 15 Gráfica de superficie de respuesta de fuente de carbono vs temperatura de incubación.	85
Fig. 16 Gráfica de superficie de respuesta de concentración del extracto de levadura vs temperatura de incubación.	86
Fig. 17 Cromatografía en capa fina de los estándares de azúcar y las muestras del EPS hidrolizado producido a 4°C y 28°C.	87
Fig. 18 Espectros FT-IR de EPS producido a 4 °C y 28 °C.	91
Fig. 19 Espectro de ¹ H RMN de EPS producido a 4 °C.	93
Fig. 20 Espectro de ¹ H RMN de EPS producido a 28 °C.	94
Fig. 21 Morfología de los microorganismos empleados en la prueba de crioprotección después del primer ciclo de congelamiento/deshielo.	98
Fig. 22 Morfología de los microorganismos empleados en la prueba de crioprotección después del séptimo ciclo de congelamiento/deshielo.	99
Fig. 23 Evaluación del secuestro de radicales libres (% RSA) del EPS.	103

Fig. 24 Colonias y tinción Gram de bacteria KLGC-03.....	106
Fig. 25 Sistema de identificación API 20E empelado para la caracterización de la cepa KLGC-03.	107

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Biopolímeros bacterianos, composición, microorganismos productores y aplicaciones (Freitas <i>et al.</i> 2011; Kumar <i>et al.</i> 2007; Vankranenburg <i>et al.</i>).....	32
Tabla 2. EPS producidos por microorganismos aislados de ambientes marinos fríos (Nicolaus et al. 2010).	33
Tabla 3. Componentes del medio de cultivo 1.	39
Tabla 4. Componentes del medio de cultivo 2.	40
Tabla 5. Factores y niveles del DCC 2 ³	51
Tabla 6. Producción de EPS por el método de Rojo Congo.	64
Tabla 7. Componentes del medio de cultivo modificado.	76
Tabla 8. Diseño experimental de la optimización del EPS por un Diseño Central Compuesto 2 ³	80
Tabla 9. Análisis de varianza para el modelo de superficie de respuesta cuadrática para la optimización de la producción de EPS.	81
Tabla 10. Comparación de los Rf de estándares con los hidrolizados del EPS.	87
Tabla 11. Composición química del EPS obtenido en condiciones óptimas.	88
Tabla 12. Prueba de crioprotección (viabilidad de los microorganismos después de 7 ciclos de congelamiento/deshielo).	97
Tabla 13. Diámetro de halos de inhibición en Escherichia coli ATCC 11229.	104
Tabla 14. Resultados de pruebas bioquímicas en cepa KLGC-03 y E.coli ATCC 11229.	108

ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
EPS	Exopolisacárido
CPS	polisacáridos capsulares
g/L	gramo sobre litro
mM	milimolar
mL	mililitro
rpm	revoluciones por minuto
(v/v)	volumen sobre volumen
(p/v)	peso sobre volumen
µg/mL	microgramos sobre mililitro
µL	microlitro
nm	nanómetros
N	Normal
mg/mL	microgramo sobre mililitro
g	gramos
pH	potencial de hidrógeno
FT-IR	Transformada de Fourier-Infrarrojo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
mm	milímetros
cm	centímetros
TLC	cromatografía en capa fina
DCC	Diseño Central Compuesto
OH	grupo hidroxilo
D ₂ O	óxido de deuterio (agua pesada)
ONPG	Ortho-nitrophenil-β-D-galactopyranoside

EQUIPOS Y REACTIVOS

REACTIVOS

Formula	Nombre	Marca
C ₆ H ₁₂ O ₆	Dextrosa anhidra	DEQ
	Extracto de levadura	EM
	Peptona de caseína	BIOXON
	Agar bacteriológico	BIOXON
CaCl ₂	Cloruro de calcio	PQM
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fosfato de sodio monobásico	CTR
MgSO ₄	Sulfato de magnesio	J.T. Baker
C ₇ H ₄ N ₂ O ₇	Ácido 3,5-dinitrosalicílico	ALDRICH
NaOH	Hidróxido de sodio	MACRON
KNaC ₄ H ₄ O ₆	Tartrato de sodio y potasio	J.T. Baker
	Protein Assay	BIO-RAD
C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	DPPH	Santa Cruz Biotechnology
CH ₄ O	Metanol	AMRESKO
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico	MACRON
C ₄ H ₁₀ O	1-Butanol	CTR
C ₂ H ₆ O	Etanol	DEQ
Na ₂ B ₄ O ₇	Tetraborato de sodio	Sigma Aldrich
C ₁₂ H ₁₀ O	2-fenil-fenol	Sigma Aldrich
C ₆ H ₈ O ₆	Ácido ascórbico	PQM
C ₆ H ₁₀ O ₇	Ácido D-glucurónico	Sigma Aldrich
C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁	Kanamicina	Sigma Aldrich
C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ S	Ampicilina	Sigma Aldrich
C ₂₂ H ₄₃ N ₅ O ₁₃	Amikacina	KARMIKIN
C ₃ H ₈ O ₃	Glicerol	AMRESKO
C ₂ HCl ₃ O ₂	Ácido tricloroacético	CTR
	Salvado de trigo	
NaCl	Cloruro de sodio	DEQ
	Agar Müller-Hinton	BIOXON
	Caldo nutritivo	BIOXON
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarosa	MERCK
C ₅ H ₁₀ O ₅	Xilosa	Sigma Aldrich
C ₆ H ₁₂ O ₆	Galactosa	Sigma Aldrich
C ₃₂ H ₂₂ N ₆ Na ₂ O ₆ S ₂	Rojo Congo	Sigma Aldrich

EQUIPOS

Nombre	Marca
Potenciómetro	Fisher Scientific
Máquina para hacer hielo	POLAR
Congelador vertical	TOR-REY
Estufa de vacío	LAB-LINE
Bomba de vacío	FELISA
Plancha de calentamiento con agitación	Thermo Scientific
Balanza analítica	OHAUS
Espectrofotómetro UV-VIS	VARIAN
Centrífuga refrigerada	THERMOELECTRON
Microscopio binocular	CARL-ZEISS
Incubadora con agitación	BARNSTED-LABLINE
Campana de flujo laminar	LABNOCO
Autoclave automática	Tuttnauer
Incubadora con agitación	SHEL-LAB
Autoclave	AESA
Liofilizadora	LABNOCO
Incinerador	Oxford Labware
Espectrofotómetro FT-IR	Perkin Elmer
Espectrofotómetro de RMN	Varian Unity Innova

RESUMEN

Verónica Alvarado Martínez

Fecha de graduación: Octubre, 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: EVALUACIÓN DEL EXOPOLISÁCARIDO PRODUCIDO POR UNA BACTERIA PSICROTOLERANTE AISLADA DEL NORESTE DE MÉXICO Y SUS POTENCIALES APLICACIONES INDUSTRIALES

Número de páginas: 106

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Biotecnología

Propósito y Método del Estudio: Los ambientes fríos son de los más extremos para el desarrollo de la vida, debido a esto las bacterias psicrotolerantes presentan un mecanismo de supervivencia que les provee la capacidad de sintetizar biocompuestos, entre los que se encuentran los exopolisacáridos (EPS), que actualmente tienen un especial interés dentro del entorno industrial, por la amplia diversidad en su composición, sus características físicas y además su valor comercial. En la microbiología industrial se utiliza la biosíntesis de EPS como xantano, alginato y levano para producirlos a gran escala, aumentando su consumo en las industrias alimentaria, farmacéutica, agrícola y también en biorremediación. Por otra parte a los EPS producidos por bacterias psicrotolerantes se les ha atribuido un rol de crioprotección a bajas temperaturas. En el presente trabajo se empleó la siguiente metodología: **1)** Seleccionar la cepa bacteriana con mayor producción de EPS. **2)** Realizar la caracterización de la cepa bacteriana seleccionada mediante pruebas bioquímicas. **3)** Optimizar la producción del EPS que produzca dicha cepa, empleando un diseño experimental, Diseño Central Compuesto (DCC) 2^3 . **4)** Purificar y determinar la composición química del EPS. **5)** Evaluar las propiedades del EPS (crioprotección, antioxidante y antimicrobiana).

Contribuciones y Conclusiones: La bacteria psicrotolerante productora de exopolisacárido se identificó como *Escherichia coli*, la cual pudo haber experimentado cambios morfológicos para sobrevivir a las bajas temperaturas del entorno de donde fue aislada. Dentro de la optimización del EPS empleando el diseño experimental DCC 2^3 se obtuvieron las condiciones adecuadas para aumentar los rendimientos del EPS (50% aprox.) en comparación con lo obtenido inicialmente. La composición del EPS producido fue de monómeros de glucosa y ácido glucurónico, además presentó también bajos porcentajes de proteínas, esto puede ayudar para que el EPS sea empleado en la biorremediación ambiental por su capacidad de captar especies catiónicas debido a su carga aniónica, conjuntamente algunas de las posibles aplicaciones industriales del EPS se pueden relacionar con sus propiedades emulgentes. En las propiedades evaluadas del EPS la más prometedora fue la propiedad crioprotectora, ya que la viabilidad y morfología de las células bacterianas tuvieron resultados positivos, por lo que la perspectiva es estudiarlo como crioprotector comercial de mayor o igual eficacia que el glicerol.

Q.F.B. Verónica Alvarado Martínez
Estudiante

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
Asesor

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Bacterias Psicrotolerantes

En la biosfera existe un amplio espectro de ambientes en el que la colonización por parte de la vida requiere una gran variedad de estrategias de adaptación. Los ambientes con temperaturas frías se encuentran entre las condiciones más extremas para la vida (Ramli *et al.* 2013). Más de tres cuartas partes de la superficie terrestre está ocupada por ecosistemas fríos que han sido colonizados exitosamente por microorganismos extremófilos conocidos como psicrófilos, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Cayol, J. L *et al.* 2015; Ramana *et al.* 2000).

Los ambientes fríos en los que se desarrollan microorganismos psicrófilos no sólo comprenden las regiones polares, árticas y antárticas, sino también glaciares, zonas de congelación permanente, océanos, zonas montañosas, cuevas, además de algunos ríos y arroyos (Mavingui *et al.* 2015; Morita & Moyer

2001). Los psicrófilos son capaces de sobrevivir en estos ecosistemas debido al desarrollo de mecanismos que les permiten hacer frente a una variedad de factores de estrés, entre los que se encuentran, temperaturas de congelación, ciclos de congelación-descongelación, la desecación, los niveles altos o bajos de salinidad o pH (Hoover & Pikuta 2009).

Las primeras bacterias capaces de reproducirse a 0 °C fueron reportadas por Foster en 1887. Años más tarde el término “psicrófilo” fue empleado por Schmidt-Nielsen en 1902 para definir a estas bacterias, pero como sólo se consideró la temperatura mínima de crecimiento en esta definición, creó una confusión temprana debido a la falta de diferenciación entre las bacterias “amantes al frío” (psicrófilas) y las “tolerantes al frío” (psicrotolerantes) (Helmke & Weyland 2004).

Morita discernió la confusión creada por la definición de Schmidt-Nielsen debido a que diferenció las bacterias psicrófilas y las psicrotolerantes, distinguiéndolas por sus temperaturas mínima, óptima y máxima de crecimiento

que son, $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para psicrófilas y $0\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $>15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $>20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para bacterias psicrotolerantes (Morita 1975). Sin embargo para las bacterias psicrotolerantes sus rangos de temperatura máxima de crecimiento pueden estar por encima de los $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en algunos casos su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra también por encima de los $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para que una bacteria sea considerada como psicrotolerante se toma en cuenta su temperatura mínima de crecimiento independientemente de la temperatura óptima de crecimiento (Morita & Moyer 2001).

Los microorganismos psicrotolerantes se encuentran frecuentemente en ambientes fríos, ya que tienen una mejor capacidad de adaptación nutricional, metabólica y funcional, y también a la transferencia de genes de microorganismos mesófilos (Hoover & Pikuta 2009; Pradesh & Vishwavidyalya 2012). Sin embargo, los psicrotolerantes también pueden habitar en ambientes que presenten temperaturas más templadas (Tarpgaard *et al.* 2006).

La supervivencia de los microorganismos a bajas temperaturas es permitida por una serie de cambios fisiológicos y morfológicos. Los cambios en los productos metabólicos ocurren como resultado de la disminución en la actividad enzimática, la temperatura reducida durante el crecimiento conduce a un desequilibrio metabólico y el cese del crecimiento debido a la sensibilidad de algunos procesos metabólicos reguladores. Cuando la temperatura disminuye algunos de los componentes que son normalmente fluidos, se convierten en gel, lo que impide que las proteínas funcionen correctamente (Margensin *et al.* 2008).

En bacterias psicrófilas y psicrotolerantes especialmente, se ha encontrado principalmente una modificación esencial en los ácidos grasos de la membrana para mantener la fluidez de la misma. Se ha descrito que sus membranas presentan un mayor contenido de ácidos grasos insaturados de cadenas cortas más ramificadas, facilitando el estado semifluido de la membrana y evitando así su congelamiento a bajas temperaturas. También se encontró que

sintetizan más ácidos grasos *cis* con preferencia a los ácidos grasos *trans* (Ray *et al.*1998).

Sufren también de modificaciones en las proteínas que se localizan en su membrana, ya que se ha encontrado que estas presentan alteraciones en su forma o cambios conformacionales, logrado a través de la reducción en fuerza y número de interacciones no covalentes, como la unión hidrófoba. Esto estabiliza el plegamiento y permite una mejora en la captación de nutrientes para mantener biológicamente activas a estas bacterias.

También son capaces de sintetizar enzimas que funcionan de manera óptima en frío y que con frecuencia se desnaturalizan a temperaturas templadas. Las bases moleculares que le permiten tolerar estas condiciones aún no han sido descritas, sin embargo se ha determinado que estas enzimas poseen mayor cantidad de hélice- α y menor cantidad de hoja- β , también se ha encontrado que estas enzimas presentan mayor cantidad de aminoácidos polares y menos

hidrófobos, en comparación con enzimas presentes en microorganismos mesófilos y termófilos.

Por otra parte la adaptación de un organismo a bajas temperaturas se asocia con la supresión de la síntesis de proteínas de choque térmico y el aumento de la producción de proteínas de choque frío como factor desencadenante, factores que contribuyen a la mejora de la viabilidad de los organismos a bajas temperaturas (Sengupta & Chattopadhyay 2013).

El mecanismo de supervivencia usado por los microorganismos psicotolerantes más atractivo para el entorno industrial es su capacidad de sintetizar biocompuestos, a los cuales se les ha evaluado para conocer las propiedades y beneficios que puedan aportar, tales como:

- ◆ Producción de enzimas.

- La lipasa que produce la bacteria psicrófila *Pseudomonas sp.* Cepa YY31, muestra alta actividad a bajas temperaturas, actúa como biocatalizador en la producción de productos farmacéuticos,

cosméticos y alimentos, síntesis de biodiesel y aditivos en detergentes para lavado en frío (Yamashiro *et al.* 2013).

- La peptidasa producida por la bacteria *Acinetobacter* sp. MN 12 muestra compatibilidad con tensoactivos, agentes oxidantes y detergentes comerciales, además se mostró su efectividad para eliminar las manchas de sangre seca en tejidos de algodón a bajas temperaturas (Salwan & Kasana 2012).
- Las características estudiadas en la β -galactosidasa producida por *Halomonas* sp. S62 sugieren que puede ser candidata para investigaciones médicas y aplicaciones en la industria alimentaria (Wang *et al.* 2013).

♦ Producción de antioxidantes.

Como los carotenoides producidos por la bacteria psicotolerante *Sphingobacterium antarcticus*, que proporcionan protección contra el daño

fotodinámico y contra la radiación ultravioleta al microorganismo (Jagannadham *et al.* 2000).

- ♦ Producción de antimicrobianos.

Producidos por la bacteria psicrotolerante *Serratia proteamaculans*, que presenta una potente actividad antibacteriana y podrían ser una alternativa a los antibióticos convencionales (Sánchez *et al.* 2013).

- ♦ Producción de exopolisacáridos (EPS).

Presentan una variedad de propiedades para ser utilizados a nivel industrial, por ejemplo el EPS producido por la bacteria psicrófila *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653, presenta propiedades crioprotectoras en ciclos de congelamiento/deshielo (Kim & Yim 2007).

En años recientes los exopolisacáridos han alcanzado un alto valor comercial, debido a sus diversas propiedades y aplicaciones industriales, por lo que este proyecto se orientará a su producción.

1.2 Exopolisacáridos microbianos

Los polisacáridos microbianos pueden reemplazar directamente a los polisacáridos extraídos de plantas (por ejemplo, pectina) o algas (por ejemplo, alginato) ya que son materiales poliméricos industrialmente importantes, debido a la gran diversidad de sus propiedades físico químicas (por ejemplo, xantano o gelano) y poco a poco se han convertido económicamente competitivos con las gomas naturales (Freitas *et al.* 2009; Carrión *et al.* 2015).

1.2.1 Localización y composición de exopolisacáridos microbianos

Los polisacáridos microbianos son productos metabólicos producidos en dos formas, polisacáridos capsulares (CPS), que rodean a la célula bacteriana y exopolisacáridos (EPS), que se encuentra como limo (red) que esta débilmente unido a la superficie celular, independientemente de la forma en la que se encuentre el polisacárido su principal función será proteger a la célula en su

entorno. Los EPS de origen microbiano están presentes en ambientes naturales, poseen propiedades únicas y son sintetizados por bacterias que pueden estar presentes en agua, suelo, ambientes marinos y ecosistemas con condiciones extremas (Mancuso Nichols *et al.* 2005; Brune 2013).

Los EPS son polímeros heterogéneos, que contienen un amplio rango de carbohidratos así como sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Son secretados por un gran número de bacterias y son un factor esencial para su supervivencia, ya que ayudan a estos microorganismos a hacer frente a condiciones ambientales adversas (Wan *et al.* 2011).

Los EPS están compuestos principalmente de homopolisacáridos o heteropolisacáridos muy ramificados, entre los que se pueden encontrar pentosas o hexosas tales como, D-xilosa, D-ribosa, D-glucosa, L-ramnosa, D-manosa, ácido D-glucurónico, D-galactosamina. Diversos EPS presentan un alto peso molecular entre 1×10^5 a 3×10^5 Da, debido a las cadenas principales de

carbono. También pueden contener cantidades significativas de aminoácidos (Mata *et al.* 2008; Margensin *et al.* 2008).

Algunos EPS son macromoléculas neutras, pero la mayoría son polianiónicas debido a la presencia de cualquiera de los ácidos urónicos (siendo el ácido D-glucurónico el más común, aunque también pueden encontrarse los ácidos D-galacturónico y D-manurónico). Aunque la presencia de residuos inorgánicos, tales como fosfato, o raramente sulfato, también le pueden conferir un estado polianiónico.

La composición y estructura de los polisacáridos determina su conformación primaria. Además, la configuración secundaria ordenada suele tomar la forma de hélices. En algunos de estos polímeros la cadena principal está compuesta por enlaces β -1,4 o β -1,3, que pueden conferir una estructura rígida, como se ve en la cadena principal celulósica de xantano de *Xanthomonas campestris*. Otros enlaces en polisacáridos pueden producir estructuras más

flexibles, como los enlaces α -1,2 o α -1,6, encontrados en estructuras de dextranos (Nicolaus *et al.* 2010).

Aunque la composición de EPS y las propiedades físicas y químicas de estos biopolímeros pueden variar mucho, generalmente los azúcares son el componente más abundante, representando del 40% al 95% de las sustancias poliméricas extracelulares, sin embargo independientemente de los sustratos de carbono presentes en su composición, estos no parecen funcionar como reserva de energía y los microorganismos no pueden catalizarlos. La mayoría de las bacterias liberan la principal cantidad de EPS durante la fase estacionaria en un cultivo en crecimiento en el laboratorio (Nichols *et al.* 2005).

1.2.2 Biosíntesis de exopolisacáridos microbianos

Las diferentes clases de EPS se pueden distinguir basándose en el mecanismo de la biosíntesis y los precursores necesarios. La biosíntesis de EPS

incluye tres fases principales: la asimilación de un sustrato de carbono, la síntesis intracelular del polisacárido y su secreción fuera de la célula.

Las vías biosintéticas bacterianas comprenden captación del sustrato, por la vía metabólica central y la síntesis de polímero. Dependiendo del tipo de sustrato, puede ser tomado por la célula a través de un transporte activo o pasivo, este se cataboliza por la vía de la fosforilación intracelular, o puede ser transportado y oxidado a través de la vía oxidativa periplásmica. Esta vía oxidativa solo existe en ciertas bacterias, mientras que la vía de la fosforilación intracelular se encuentra presente en todas las bacterias. Ambos sistemas han sido reportados en bacterias productoras de EPS y pueden funcionar simultáneamente si el sustrato está disponible. En el citoplasma, el sustrato se cataboliza a través de la glucólisis y los metabolitos primarios formados se utilizan como precursores para la síntesis de pequeñas biomoléculas (por ejemplo, aminoácidos o monosacáridos). La síntesis de polisacáridos requiere la biosíntesis de los precursores activados que son ricos en energía como,

monosacáridos, azúcares difosfato, principalmente nucleósidos (NDP-azúcares), que derivan de azúcares fosforilados.

El mecanismo de biosíntesis de EPS depende del tipo de polisacárido. En el caso de homopolisacáridos (por ejemplo, dextrano, levano o mutano) la reacción de polimerización se produce gracias a una glicosiltransferasa extracelular que es capaz de transferir una unidad de monosacárido desde un disacárido a una cadena de polisacárido creciente. En el caso de homopolisacáridos o heteropolisacáridos con unidades de repetición, el montaje de unidades de repetición tiene lugar en el citoplasma a través de la acción de glicosiltransferasas específicas responsables de la transferencia continua de residuos de azúcar a un transportador lipofílico. Una vez formada la cadena de azúcares se procede a la secreción de EPS fuera de la célula, el cual es un proceso difícil para la bacteria, en la que los polímeros hidrófilos de alto peso molecular, se reúnen en el citoplasma para atravesar la envoltura celular.

La longitud de los polímeros producidos y su eventual modificación química, es decir, reacciones de acetilación y piruvilación, y la adición de sustituyentes fosfato o sulfato están bajo control genético y enzimático (glicosiltransferasas).

En contraste con la amplia diversidad de las estructuras moleculares que se encuentran en los EPS, se han reportado las vías para su biosíntesis y exportación en la mayoría de las bacterias Gram negativas de seguir alguno de estos dos mecanismos: la vía dependiente *Wzy*, en la que la repetición de polímero la unidad se monta en la cara interna de la membrana citoplasmática y se polimeriza en el periplasma, y la vía transportador dependiente de *ABC*, en el que la polimerización se produce en la cara citoplásmica de la membrana interna.

Diversos estudios fisiológicos han revelado el efecto de factores tales como la temperatura, pH, oxígeno y la relación carbono/nitrógeno (C: N) sobre la disponibilidad de los precursores de nucleótidos de azúcar y por lo tanto sobre la producción de EPS. Sin embargo, la regulación de la biosíntesis de EPS es aún

muy poco conocida. Es necesario más conocimiento sobre la genética y la bioquímica de la biosíntesis de EPS para ser capaz de diseñar con éxito las propiedades de los polisacáridos mediante la modificación de la composición y la longitud de la cadena (Freitas *et al.* 2009; Finore *et al.* 2014; Nicolaus *et al.* 2010).

Las ventajas de producir EPS por medio de biosíntesis es que los polisacáridos son polímeros naturales, no tóxicos y biodegradables. Y también presentan la capacidad para interaccionar con materiales de origen biológico y sintético (Öner 2013).

1.2.3 Aplicaciones de exopolisacáridos microbianos

Existe gran interés en los EPS dentro de la industria, en la microbiología industrial se utiliza la biosíntesis de xantano, alginato, celulosa, levano para obtenerlos a escala industrial, aumentando su consumo en las industrias de la alimentación, la medicina, la agricultura y el tratamiento de aguas residuales (Nicolaus *et al.* 2010). En la industria alimentaria solo dos exopolisacáridos están

autorizados como aditivos en los Estados Unidos y Europa, los cuales son xantana y gelano, a pesar de la gran diversidad de EPS microbianos con propiedades fisicoquímicas que son industrialmente prometedoras (Donot *et al.* 2012). Los EPS de origen microbiano tienen un especial interés dentro de varios sectores de la industria, por la amplia diversidad en su composición y sus características físicas (Di Pippo *et al.* 2013).

Por otra parte los productos especializados debido a las adaptaciones bioquímicas de bacterias psicrófilas y psicrotolerantes en condiciones extremas, como los EPS, representan un rol importante para la supervivencia y desarrollo de estos microorganismos, debido a que les proporcionan crioprotección en alta salinidad y bajas temperaturas. Y juntos los EPS y los microorganismos forman biopelículas que le confieren resistencia a una variedad de desafíos estresantes incluyendo antibióticos, cambios osmóticos, limitaciones de nutrición, los fagocitos y la exposición a la radiación (Nichols *et al.* 2005; Wu *et al.* 2012).

Tabla 1. Biopolímeros bacterianos, composición, microorganismos productores y aplicaciones (Freitas *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2007; Vankranenburg *et al.*).

Exopolisacárido	Monómeros	Microorganismo	Aplicación
Xantana	Glucosa, manosa, ácido glucurónico	<i>Xanthomonas campestris</i>	En la industria alimentaria como espesante y estabilizante, en la industria del petróleo para la recuperación de crudo y en la formulación de plaguicidas, detergente cosméticos y productos farmacéuticos.
Gelano	Glucosa, ramnosa, ácido glucurónico	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Biotechnología (solidificación de medios de cultivo).
Alginato	Ácido gulurónico, ácido manurónico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Azotobacter vinelandii</i>	Agente de encapsulación de drogas, recubrimiento de raíces y plantas para evitar la desecación.
Dextrano	Glucosa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	En medicina humana y veterinaria como extensor de plasma de sangre o de flujo sanguíneo, en biotecnología apoya en la separación.
Ácido hialurónico	Ácido glucurónico, N-acetil glucosamina	<i>Streptococcus equi</i> , <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	En la industria cosmética (cremas o agente humectante), en medicina como sustituto del líquido ocular en cirugía oftálmica.
Ácido colánico	Fucosa, glucosa, glucuronato, galactosa	<i>E. coli</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i>	Industria cosmética y productos de cuidado personal.
Levano	Fructosa	Varios	Industria alimentaria (prebióticos)

Tabla 2. EPS producidos por microorganismos aislados de ambientes marinos fríos
(Nicolaus *et al.* 2010).

Microorganismo	Origen	Descripción del EPS y su composición química	Papel sugerido y aplicación biotecnológica	Referencia
<i>Pseudoalteromonas</i> cepa SM9913	Los sedimentos de aguas profundas en el Golfo de Bohai, Golfo del Mar Amarillo en China.	Disposición lineal de $\alpha(1\rightarrow6)$ vinculación de la glucosa con un alto grado de acetilación.	Comportamiento de floculación y la capacidad de bio-sorción.	Qin, K. <i>et al.</i> 2007 Li, W.W et al. 2008
<i>Pseudoalteromonas</i> cepa CAM025	Aislado de partículas fundidas del fondo del Mar Antártico.	Heteropolisacáridos sulfatados, con altos niveles de ácidos urónicos con grupos acetilo. Glc:GalA:Rha:Gal (1:0.5:0.1:0.08)	Crioprotección.	Mancuso Nichols, C.A. 2004.
<i>Colwellia psychrerythraea</i> cepa 34H	Sedimentos marinos del Ártico.	No reportado.	Crioprotección.	Marx, J.G. 2009

1.3 Justificación

Justificación

Debido a la capacidad de las bacterias para sintetizar compuestos conocidos como exopolisacáridos, se buscará alguna aplicación a este compuesto dentro de un sector industrial, con base a las propiedades que presente.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El exopolisacárido producido por la bacteria psicrotolerante autóctona tiene aplicaciones industriales.

2.2 Objetivo general

Obtener un exopolisacárido cuyas propiedades puedan ser empleadas dentro de la industria.

2.3 Objetivos específicos

1. Seleccionar la cepa bacteriana con mayor producción de EPS.
2. Realizar la caracterización de la cepa bacteriana seleccionada.
3. Optimizar la producción del exopolisacárido (EPS) que produzca dicha cepa, empleando un diseño experimental.
4. Purificar y determinar la composición química del EPS.
5. Evaluar las propiedades del EPS (crioprotectora, antioxidante y antimicrobiana).

El presente trabajo se realizará en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las cepas empleadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.1 Crecimiento de cultivos microbianos

Los crecimientos de los cultivos bacterianos se realizaron inicialmente para la selección de las cepas productoras de EPS y posteriormente para cuantificar los rendimientos de EPS, seguido de una modificación del medio de cultivo para aumentar la producción de EPS.

3.1.1 Selección de cepas productoras de EPS por el Método de Rojo Congo

El método para seleccionar las cepas productoras de EPS fue el de Rojo Congo, el cual nos indica que la presencia del EPS es positiva cuando se presenta un crecimiento blanquecino en las colonias bacterianas, impidiendo así la adsorción del colorante, en el caso de que las colonias presenten una coloración roja nos indica la ausencia del EPS (Bravo *et al.* 2005). Para ello se empleó un medio de cultivo sólido con la composición dada en la Tabla 3. El pH del medio de cultivo se ajustó a 7.0 con NaOH 1 M, previo a la esterilización a 15 psi durante 15 minutos. Posteriormente la siembra se realizó en condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar, usando un incinerador para esterilizar el asa microbiológica con la cual se realizaron las siembras partiendo del mismo inóculo. Al transcurrir 24 horas de incubación a 28 °C, se observó el crecimiento bacteriano en las cajas Petri.

Tabla 3. Componentes del medio de cultivo 1.

Componentes	Concentración
Glucosa	20 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Peptona de caseína	2 g/L
Cloruro de calcio	0.4 g/L
Sulfato de magnesio	0.2 g/L
Fosfato de sodio monobásico	100 mM
Rojo Congo	0.25 g/L
Agar bacteriológico	20 g/L

3.1.2 Crecimiento de cepas para cuantificar EPS

Las cepas que mostraron la presencia del EPS por el método del Rojo Congo se cultivaron en medio líquido, previo a la realización del cultivo bacteriano se reactivó la cepa durante 24 horas para emplear un inóculo del 1 % en las

fermentaciones. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL del medio de cultivo 2 (Tabla 4), a continuación se procedió de forma análoga como en el caso anterior con respecto a las condiciones del medio. Posteriormente la siembra se realizó en condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar, utilizando puntillas estériles para inocular los matraces partiendo del mismo inóculo. Los matraces se incubaron a una temperatura de 28 °C a 150 rpm.

Tabla 4. Componentes del medio de cultivo 2.

Componentes	Concentración
Glucosa	20 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Peptona de caseína	2 g/L
Cloruro de calcio	0.4 g/L
Sulfato de magnesio	0.2 g/L
Fosfato de sodio monobásico	100 mM

3.2 Extracción de exopolisacárido

Cada 24 horas se tomaron alícuotas de 10 mL de los cultivos anteriores durante una semana, posteriormente se centrifugaron a 4300 rpm durante 15 minutos, empleando una centrifuga refrigerada a 4 °C. Una vez separados el paquete celular del sobrenadante, se procedió a decantar el sobrenadante en otro tubo para añadirle dos volúmenes de etanol frío (-20 °C) al 96 % (v/v) para así precipitar el EPS, dejándolo en reposo durante 16 horas a 4°C, para posteriormente centrifugar a 4300 rpm durante 20 minutos y obtener el pellet de EPS. El pellet obtenido se liofilizó hasta eliminar completamente la humedad para posteriormente pesar el producto obtenido (Fig. 1). De esta forma se obtuvieron los rendimientos del EPS de cada cepa.

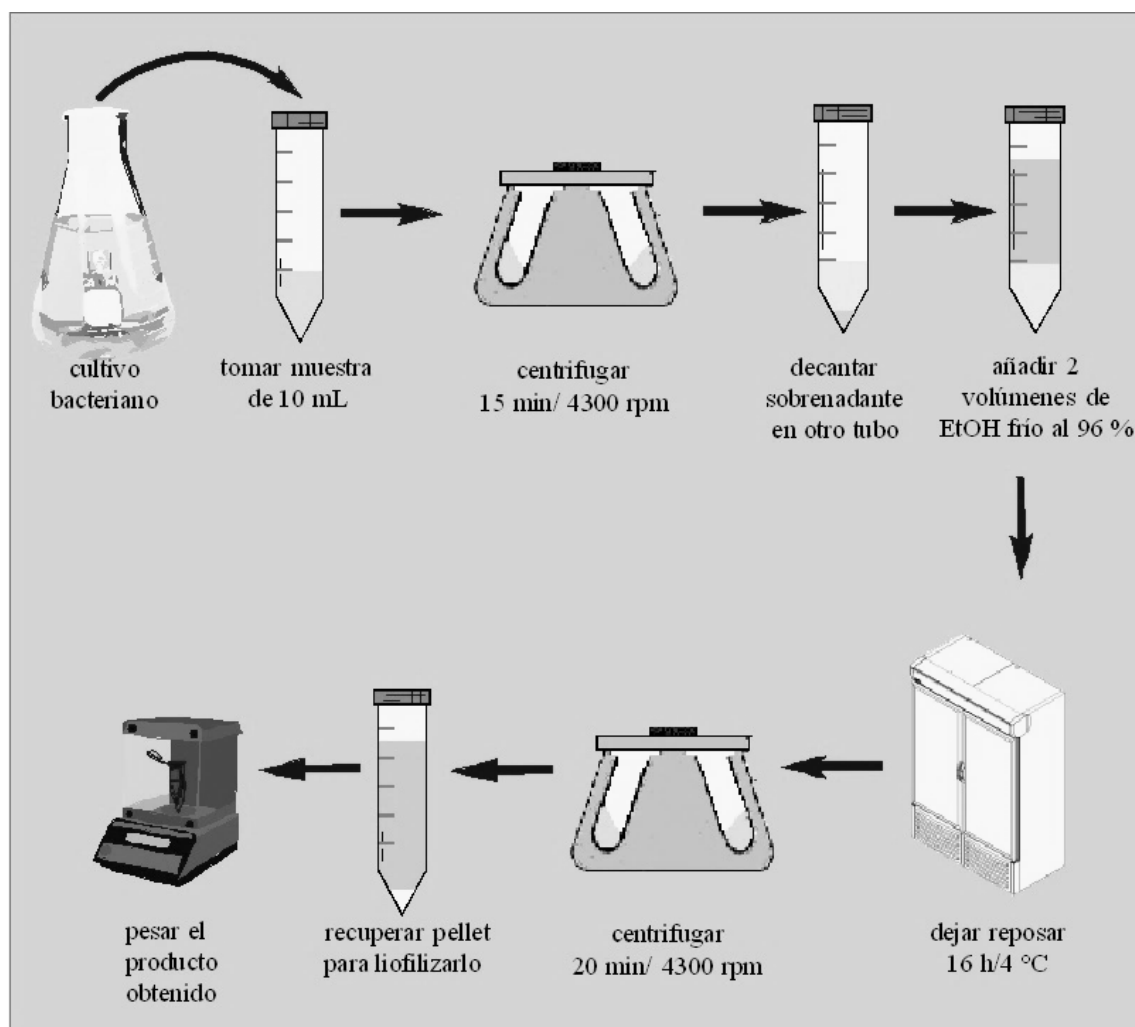


Fig. 1 Método de extracción de EPS.

3.3 Experimentos previos a la optimización de producción de exopolisacáridos

Una vez que se cuantificó el EPS de las cepas seleccionadas por el método de Rojo Congo se procedió a realizar variaciones al medio de cultivo para

aumentar los rendimientos de producción de EPS, los cuales se describen a continuación:

3.3.1 Variación en la fuente de nitrógeno

El medio original usado para la producción de EPS, contenía dos componentes que aportaban la fuente de nitrógeno para el crecimiento celular y la consecuente producción de EPS, la peptona de caseína y el extracto de levadura. Sin embargo se procedió a realizar variaciones en medio de cultivo debido a que un exceso de esta fuente puede disminuir la conversión del sustrato en EPS.

Por lo que se prepararon medios de cultivo líquidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL, en los cuales a un lote se le adicionó solo la peptona de caseína y a otro lote se le agregó el extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Para posteriormente cuantificar el EPS producido por gravimetría y

elegir la fuente de nitrógeno con la que se obtuvieran mejores rendimientos en la producción de EPS.

3.3.2 Variación en la concentración de fuente de carbono

La fuente de carbono inicial utilizada para la producción de EPS fue la glucosa, se procedió a realizar variaciones de 20 g/L y 40 g/L en un medio líquido en matraces Erlenmeyer de 250 mL, para conocer si al aumentar la concentración de la fuente de carbono aumentaría también la producción de EPS en las cepas seleccionadas. La cantidad de EPS producido por las variaciones de la concentración de glucosa se determinó por gravimetría y de esta forma se pudo comparar si una alta concentración de esta fuente favorecía o inhibía la producción de EPS.

3.3.3 Variación de presencia/ausencia de fosfato de sodio monobásico

Otra variación evaluada en la producción de EPS por las cepas seleccionadas fue la presencia o ausencia de fosfato de sodio monobásico 50 mM, ya que este debe encontrarse a bajas concentraciones para el aumento de la producción de EPS (Mata *et al.* 2006).

Se prepararon dos lotes de medio de cultivo líquido en matraces Erlenmeyer de 250 mL, al primer lote se le adicionó el fosfato de sodio monobásico, ajustando el pH del medio a 7.0 con NaOH 50 % (p/v) empleando un potenciómetro Fisher Scientific. Al segundo lote no se le adicionó el fosfato de sodio monobásico, así como tampoco se procedió a ajustar el pH del medio de cultivo. La cuantificación de EPS producido en ambos lotes se determinó por gravimetría.

3.4 Método de purificación de exopolisacárido

Una vez seleccionada la cepa con mayor producción de EPS ya realizadas las variaciones al medio de cultivo, se precedió a cuantificar sus rendimientos de EPS de la cepa cada 24 horas durante una semana y se observó que la mayor producción de EPS se presentaba a las 72 horas, por lo que para la extracción se tomó un cultivo de 72 horas de crecimiento, al cual se le adicionó ácido tricloroacético a una concentración final de 4%, esto fue llevado a agitación por 20 minutos, luego se centrifugó a 4300 rpm por un tiempo de 20 minutos en una centrifuga refrigerada a 4 °C para sedimentar las células y las proteínas precipitadas. Seguidamente se separó el sobrenadante al cual se le agregó dos volúmenes de etanol frío al 96 %, dejándolo en reposo durante 16 horas a 4°C para proceder a separar el precipitado por centrifugación a 4300 rpm por 20 minutos a 4 °C y el EPS precipitado fue disuelto en 1/10 del volumen de agua. A continuación el EPS disuelto en agua se llevó a diálisis por 24 horas en contra de agua, con la finalidad de eliminar las sales restantes del medio de cultivo.

Finalmente, después de la diálisis al EPS se le añadieron dos volúmenes de etanol frío al 96 % para precipitarlo y separarlo por centrifugación a 4300 rpm por 20 minutos para proceder a la liofilización del biopolímero (Fig. 2).

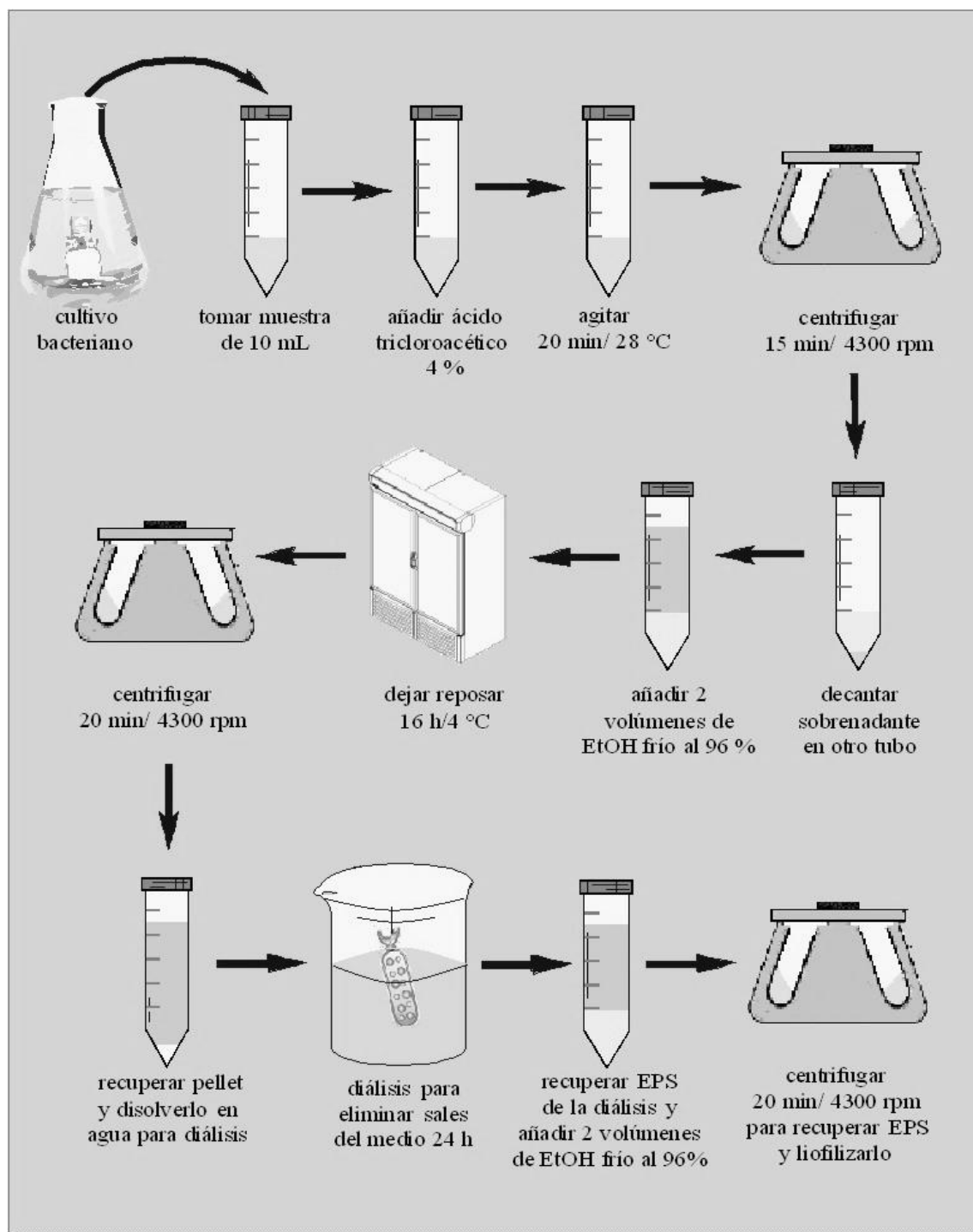


Fig. 2 Método de purificación de EPS.

3.5 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford para realizar curva de crecimiento

Para la determinación de proteína soluble, se empleó el kit Bradford Protein Assay de Bio-Rad, el cual es un exacto y simple procedimiento para determinar la concentración de proteína solubilizada, que consiste en la adición de un colorante ácido a la solución de proteína, y la posterior medición a 595 nm con un espectrofotómetro. Para la curva de calibración se utilizó un estándar de albúmina sérica bovina (Bio-Rad) a una concentración de 2.5 µg/mL.

Para la cuantificación de las proteínas de las fermentaciones realizadas, se añadieron 800 µl de muestra y 200 µl de reactivo de Bradford en un tubo y se dejó reposar durante 5 minutos a la temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se pasó a una celda para leer la absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS VARIAN a una longitud de onda de 595 nm. Empleando el medio de cultivo como blanco.

3.6 Diseño de experimentos para la optimización de la producción de exopolisacárido empleando una fuente de carbono alternativa (salvado de trigo)

Para el diseño se seleccionó la cepa que presentó mayor producción de EPS en los experimentos previos de variaciones del medio de cultivo. Y se optó por manejar una fuente de carbono alternativa como el salvado de trigo, ya que los costos de este son bajos en comparación con la fuente de carbono empleada (glucosa) y esto reduciría los costos de los componentes del medio de cultivo.

El diseño se realizó mediante superficies de respuesta en un diseño central compuesto (DCC) 2^3 con tres réplicas, donde los factores fueron la fuente de carbono (glucosa y salvado de trigo), concentración de extracto de levadura (0.25 g/L y 2.5 g/L) y por último la temperatura de incubación (4 °C y 37 °C), para el análisis estadístico de los resultados se trabajó con el programa Design expert 7.0.0.

Tabla 5. Factores y niveles del DCC 2³.

Factores	Nivel bajo	Nivel alto
A: Fuente de carbono	Glucosa	Salvado de trigo
B: Concentración del extracto de levadura	0.25 g/L	2.5 g/L
C: Temperatura de incubación	4°C	37°C

3.7 Técnicas instrumentales y análisis para la caracterización del exopolisacárido

3.7.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

La identificación de los posibles monosacáridos que componen el EPS producido por la bacteria psicotolerante seleccionada se evaluó mediante una cromatografía de capa fina (TLC).

Para efectuar la identificación de un polisacárido por cromatografía se tuvo que realizar previamente una hidrólisis ácida para separar a los monómeros presentes en el EPS. La hidrólisis ácida del EPS producido por la bacteria

psicrotolerante se llevó a cabo añadiendo ácido sulfúrico 2 N al EPS con una concentración de 10 mg/mL, en un tubo 13 x 100 durante una hora a 100 °C en baño de agua, seguida de una neutralización con hidróxido de sodio 1 N.

El sistema desarrollador utilizado fue 1-Butanol: ácido acético: agua desionizada (2:1:1). El sistema revelador fue una solución de ácido sulfúrico al 2 % en solución Etanol-Agua desionizada (1:1). Siendo la fase estacionaria una placa de gel de sílice.

Los estándares empleados para la cromatografía fueron glucosa, galactosa, sacarosa y xilosa a una concentración de 10 mg/mL.

3.7.2 Cuantificación de azúcares reductores por el método ácido 3,5-dinitrosalicílico

La cuantificación de azúcares reductores se realizó una vez efectuada la hidrólisis ácida del EPS, como se describió anteriormente. Este método se

fundamenta en la reacción de los grupos reductores de los productos de la reacción catalítica, con el reactivo oxidante ácido 3,5-dinitrosalicílico (3,5-DNS).

Los reactivos empleados fueron los siguientes:

Solución A: disolver 15 g de tartrato de sodio y potasio por agitación y calentamiento en 25 mL de agua desionizada.

Solución B: preparar una solución con 0.8 g de NaOH en 50 mL de agua desionizada, posteriormente agregar 0.5 g de ácido 3,5.dinitrosalicílico y disolver mediante agitación y calor constante.

Mezclar las soluciones A y B y aforar a 100 mL con agua desionizada y dejar reposar en frasco ámbar durante toda la noche.

La técnica empleada fue la siguiente:

- a. Se colocaron 100 μ L del EPS hidrolizado en un tubo 13 x 100 y se agregaron 1000 μ L del reactivo 3,5-DNS, se calentaron los tubos a

ebullición en un baño de temperatura por 5 minutos e inmediatamente se transfirieron los tubos a un baño de hielo durante 10 minutos.

- b. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS VARIAN a una longitud de onda de 540 nm.

La curva patrón se preparó a partir de una solución estándar de glucosa a una concentración de 1 mg/mL en agua desionizada.

3.7.3 Cuantificación de proteínas

En la determinación de proteína soluble presente en el EPS, se empleó el kit Bradford Protein Assay de Bio-Rad, como se describió anteriormente en la sección 3.5, empleando agua desionizada como blanco.

3.7.4 Determinación del contenido de ácidos urónicos

El contenido de ácidos urónicos se determinó por el método meta-hidroxifenil, el cual está basado en la hidrólisis del polisacárido por reacción con el ácido sulfúrico-tetraborato, liberándose los ácidos urónicos que reaccionan con el 2-fenil-fenol, apareciendo un cromógeno de color rosado (Blumenkrantz & Asboe Hansen 1973).

Los reactivos empleados fueron los siguientes:

2-fenil-fenol: solución de 2-fenil-fenol al 0.15 % (p/v) en NaOH al 0.5 % (p/v).

Ácido sulfúrico-tetraborato: solución de tetraborato sódico a una concentración 0.0125 M en ácido sulfúrico concentrado.

La técnica empleada fue la siguiente:

A partir de una suspensión de EPS en agua desionizada a una concentración de 1 mg/mL, se tomaron 200 µL y se le adicionaron 1.2 mL de ácido sulfúrico-tetraborato mientras se mantenía la muestra refrigerada en hielo.

Tras una agitación vigorosa se calentó durante 5 minutos a 100 °C y transcurrido ese tiempo se enfrió la muestra en hielo. En ese momento se adicionaron 20 µL de 2-fenil-fenol, se agitó vigorosamente y tras 5 minutos de reposo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS VARIAN a una longitud de onda de 590 nm.

La curva patrón se preparó a partir de una solución stock de 1 mg/mL de ácido D-glucurónico en agua desionizada.

3.7.5 Análisis del exopolisacárido por FT-IR

Se recurrió a la espectroscopia de infrarrojo para obtener los posibles grupos funcionales con los que cuenta la estructura del exopolisacárido producido por la bacteria psicotolerante, se analizó el EPS producido a 28 °C así como también el originado a 4 °C, con el fin de conocer si existía alguna variación en los grupos funcionales atribuida a la temperatura de producción. El equipo

empleado fue un Espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier (Spectrum One, Perkin Elmer) con un intervalo de medición de 650-4000 cm⁻¹.

3.7.6 Análisis del exopolisacárido por RMN

Se envió a analizar por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) el EPS producido a 28 °C así como también el producido a 4 °C, para complementar los resultados del análisis por FT-IR y obtener los posibles números y tipos de entidades químicas presentes en la molécula del EPS.

3.8 Estudio de los efectos del exopolisacárido

3.8.1 Efecto de crioprotección

Debido al papel de crioprotección que desempeñan los EPS producidos por bacterias psicrófilas y psicrotolerantes, se evaluó la capacidad crioprotectora del EPS producido por la bacteria psicrotolerante.

Esto se llevó a cabo sometiendo tres cepas diferentes a ciclos de congelamiento/deshielo, y posterior resiembra en caldo nutritivo para observar la viabilidad de los cultivos sometidos a los ciclos. Los microorganismos utilizados fueron, *Escherichia coli* ATCC 11229, una levadura proporcionada por el laboratorio de Biotecnología y la cepa psicotolerante productora de EPS. A las cuales se les añadió una concentración de 5 mg/mL de EPS disuelto en agua desionizada, se empleó como control positivo el glicerol al 25 % y como control negativo agua desionizada. Para la observación de la morfología de los microorganismos empleados en la evaluación de la prueba de crioprotección se hicieron frotis a los cultivos reactivados en caldo nutritivo y se les realizó tinción Gram (Fig. 3).

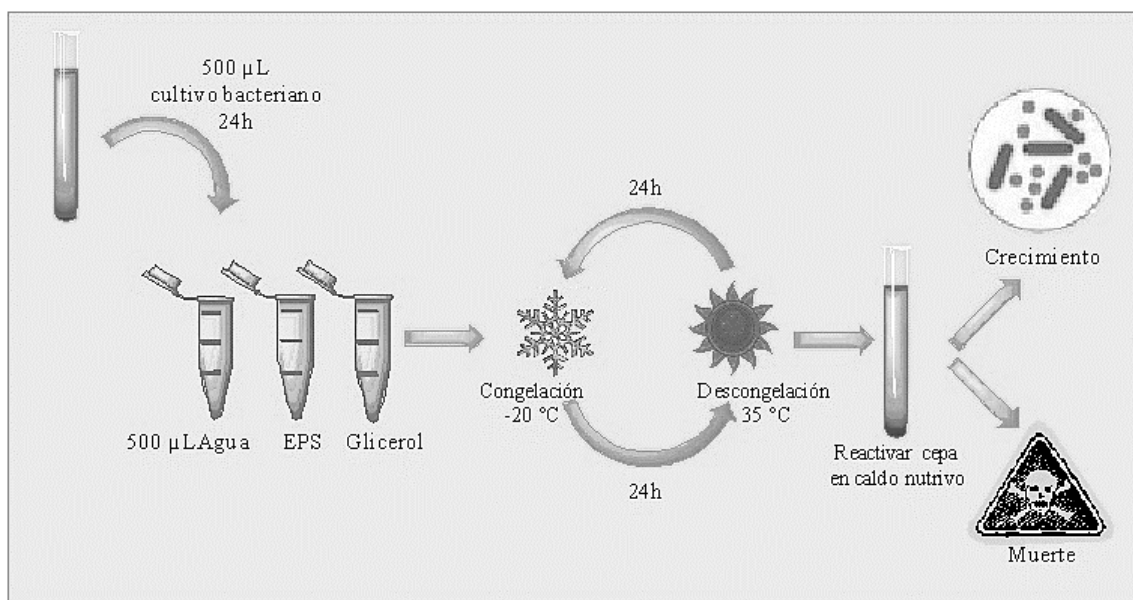


Fig. 3 Esquema del efecto de crioprotección.

3.8.2 Efecto de actividad antioxidante

Debido a la protección contra rayos ultravioleta que pueden proporcionar los EPS a las células bacterianas, se evaluó el efecto de actividad antioxidante del EPS producido por la bacteria psicotolerante.

Para el análisis del efecto de la actividad antioxidante del EPS se empleó el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Molyneux 2004), con algunas modificaciones. Se preparó la solución pesando 2.5 mg DPPH y se diluyó en 100 mL de metanol puro grado reactivo. Se leyó la absorbancia en el a una longitud

de onda de 515 nm para ajustar el radical a 0.7 ± 0.02 . Se tomaron 3.9 mL de la solución de DPPH y se adicionó 0.1 mL de EPS (de 0.05 a 1.2 mg/mL), se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se midió espectrofotométricamente a 515 nm y se expresó la actividad de secuestro de radicales libres como porcentaje de inhibición empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ RSA} = ((\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}) / \text{Abs blanco}) \times 100$$

Dónde: RSA = Actividad de secuestro de radicales libres

Abs= Absorbancia

Se empleó ácido ascórbico como referencia, ya que este presente una alta actividad antioxidante, utilizando el mismo rango de concentraciones del EPS (0.05 a 1.2 mg/mL) para así comparar los porcentajes de actividad de secuestro de radicales libres del EPS y el ácido ascórbico.

3.8.3 Efecto antimicrobiano

Debido a la resistencia contra antibióticos que proporcionan los EPS producidos por bacterias que se desarrollan en ambientes extremos, se evaluó el efecto antimicrobiano del EPS producido por la bacteria psicrotolerante.

Esto se llevó a cabo empleando la técnica convencional de antibiogramas con algunas modificaciones. Se compararon los halos de inhibición de antibióticos como ampicilina, kanamicina y amikacina a una concentración de 0.5 mg/mL, contra los halos producidos por los mismos antibióticos con la adición de EPS (1 mg/mL). El microorganismo utilizado para esta técnica fue *Escherichia coli* ATCC 11229.

3.9 Caracterización de la bacteria psicotolerante productora de exopolisacárido

Se identificó la bacteria psicotolerante empleando como pruebas iniciales; morfología de colonias y tinción Gram, observándolas al microscopio para determinar su morfología microscópica. Se realizaron las pruebas bioquímicas convencionales y posteriormente se emplearon placas API 20E de bioMérieux para confirmar la identificación bacteriana.

3.10 Manejo y disposición de residuos

Los residuos generados durante el desarrollo experimental de este proyecto fueron dispuestos en contenedores específicos de acuerdo a lo establecido por el Departamento de Residuos Peligrosos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Aquellos residuos que estuvieron en contacto con microorganismos se esterilizaron previamente a su disposición.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de cepas productoras de exopolisacáridos por el método de Rojo Congo

Se comenzó a trabajar con seis cepas psicotolerantes proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología, las cuales después de 24 horas de incubación a 28 °C se observó su crecimiento en las cajas Petri y solo el 50% fueron positivas en la determinación de producción de EPS con el método de Rojo Congo (KLGC-01, KLGC-03, KLGC-06), al desarrollarse colonias con una coloración blanquecina (Tabla 6). La presencia del biopolímero en ciertas cepas impide la absorción del colorante Rojo Congo, por lo que obstruye la coloración del cultivo bacteriano, presentando una ausencia del color rojo en las colonias desarrolladas en la caja Petri (Fig. 4). El 33 % de la cepas fueron negativas, ya que en la ausencia del EPS las colonias mostraron una coloración roja (KLGC-04, KLGC-05) e incluso hubo una cepa que no presento crecimiento bacteriano (GMTH-02). Con este método se lograron identificar las cepas de interés para el proyecto.

Tabla 6. Producción de EPS por el método de Rojo Congo.

Clave	Color de colonias desarrolladas
KLGC-01	Colonias blanquecinas
KLGC-03	Colonias blanquecinas
KLGC-04	Colonias rojas
KLGC-05	Colonias rojas
KLGC-06	Colonias blanquecinas
GMTH-02	Sin crecimiento

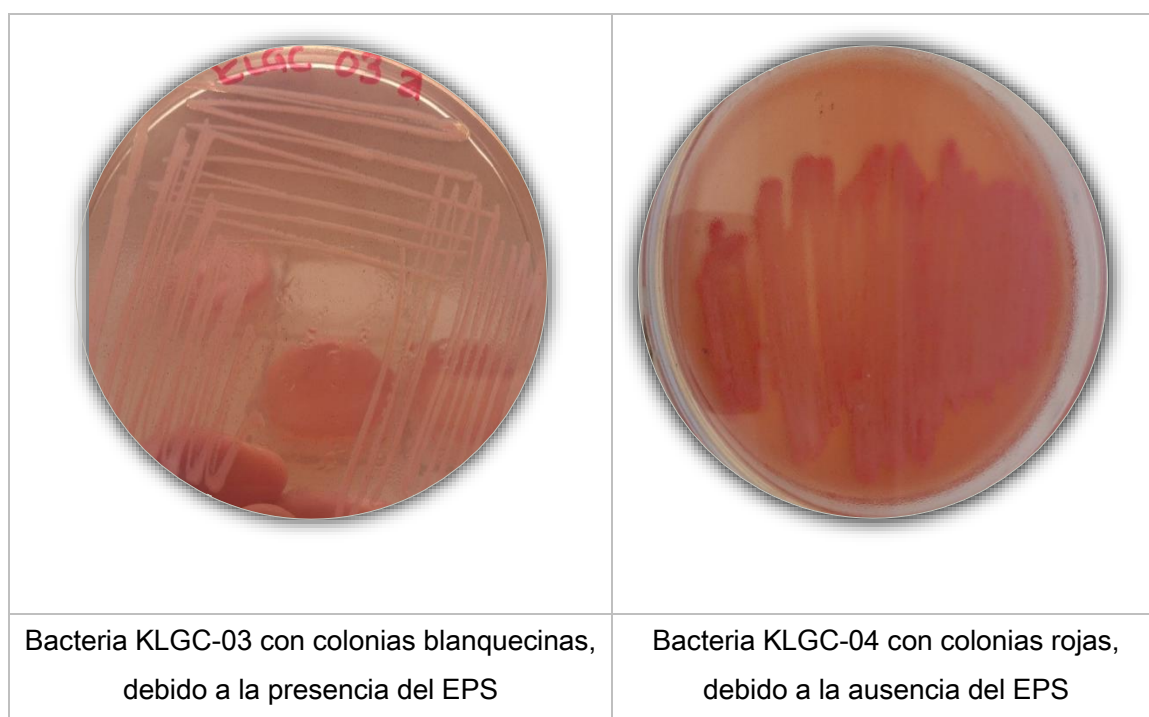


Fig. 4 Crecimiento de colonias de bacterias psicrotolerantes por el método Rojo Congo.

4.2 Experimentos previos a la optimización de producción de exopolisacárido

Para la realización de estos experimentos se utilizaron las cepas que fueron positivas por el Método de Rojo Congo con la presencia del EPS, las cuales fueron KLGC-01, KLGC-03 y KLGC-06.

4.2.1 Variación de la fuente de nitrógeno

Se varió la fuente de nitrógeno empleando peptona y extracto de levadura, para comparar la producción del EPS en las cepas seleccionadas, los gráficos obtenidos de dichas variaciones en el medio de cultivo se muestran en las figuras (Fig. 5 y Fig. 6).

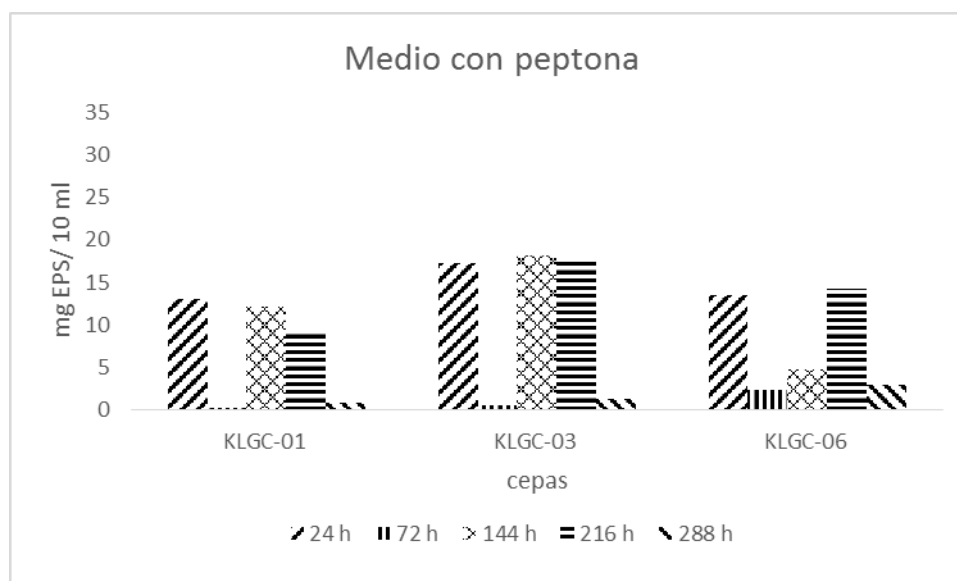


Fig. 5 Producción de EPS con la adición de peptona de caseína como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.

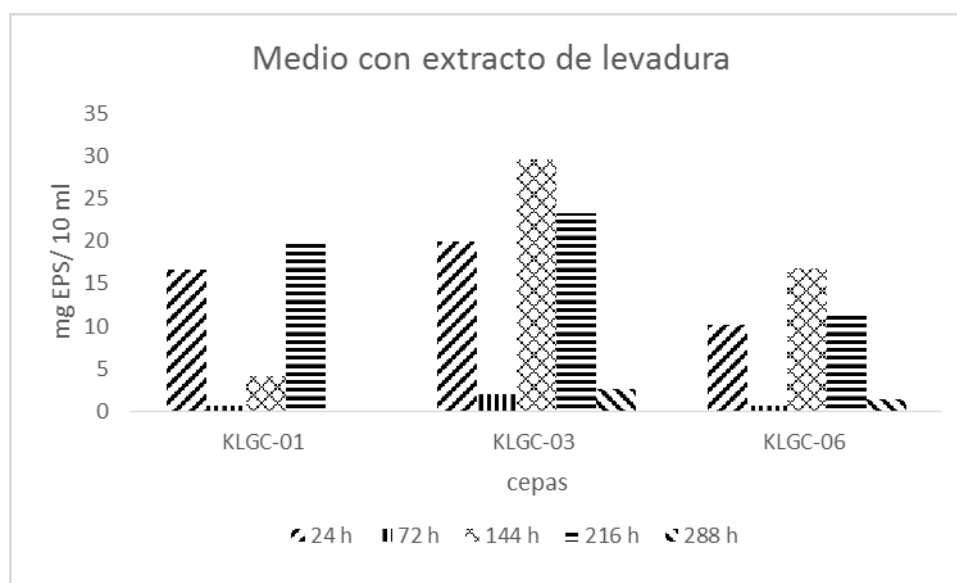


Fig. 6 Producción de EPS con la adición de extracto de levadura como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos muestran una mínima preferencia de las cepas por el extracto de levadura como fuente de nitrógeno, aunque en el caso de la cepa KLGC-03 si se muestra una considerable preferencia, por ejemplo, se obtuvieron aproximadamente 30 mg de EPS a las 144 horas de cultivo (Fig. 6), mientras que comparado con la peptona solo se obtuvieron 18 mg de EPS para la misma cepa a ese mismo tiempo (Fig. 5). En este caso se favoreció la cantidad de EPS obteniendo casi el doble, empleando como fuente de nitrógeno extracto de levadura.

Esto puede deberse a que el extracto de levadura contiene diversos factores nutrimentales que favorecen el crecimiento bacteriano en mayor cantidad que la peptona de caseína, que aunque influye sobre el desarrollo bacteriano no participa en la producción de EPS. Sin embargo la cantidad de nitrógeno total en el extracto de levadura (11.7 %) es menor que el de la peptona de caseína (12,6 %), por lo que al desempeñarse exclusivamente como fuente de nitrógeno permitió un mayor rendimiento del biopolímero (Fig. 6), ya que un

exceso de esta fuente disminuye la producción del EPS (Son *et al.* 2001). Es por ello que se optó por el extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Los rendimientos de EPS no concuerdan del todo con la teoría, la cual nos indica que la producción de EPS de la mayoría de las bacterias ocurre durante la fase estacionaria (Nichols *et al.* 2005), sin embargo las cepas tratadas muestran una producción de EPS a partir de la fase exponencial, presentando una disminución posterior a esta fase pero en la fase estacionaria vuelven a aumentar niveles de producción de EPS. Esto nos podría indicar que la producción de EPS no se encuentra directamente asociada al crecimiento bacteriano, sin embargo una vez que las bacterias logran alcanzar su crecimiento estacionario la producción de EPS comienza nuevamente.

4.2.2 Variación de la fuente de carbono

Para las variaciones de la fuente de carbono se modificó la concentración de glucosa para observar la diferencia en la producción del EPS entre las cepas

y también encontrar la concentración adecuada de la fuente de carbono para así aumentar la producción del EPS, los gráficos obtenidos de estas variaciones se muestran en las figuras (Fig. 7 y Fig. 8).

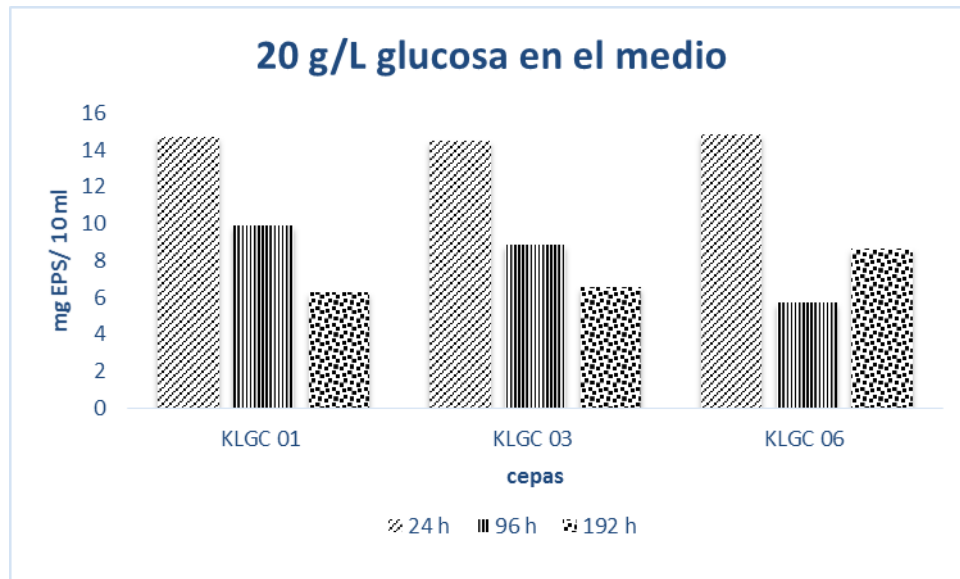


Fig. 7 Producción de EPS con una concentración de 20 g/L de glucosa en el medio de cultivo.

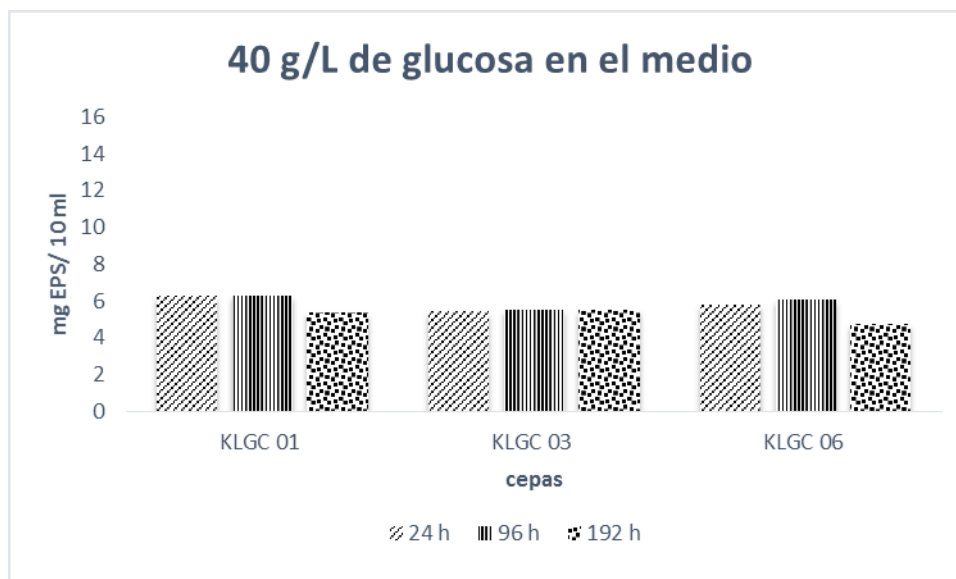


Fig. 8 Producción de EPS con una concentración de 40 g/L de glucosa en el medio de cultivo.

Los resultados para la fuente de carbono a una concentración de 20 g/L de glucosa muestran una mayor producción de EPS a las 24 horas (Fig.7), aunque los rendimientos van disminuyendo conforme transcurrieron las horas del cultivo bacteriano, en este caso no se observó un aumento en la fase estacionaria como se presentó en la fuente de nitrógeno, por lo que estos resultados nos indican que posiblemente las cepas no alcanzaron su fase estacionaria y la producción de EPS se vio afectada.

Con respecto a los resultados para la fuente de carbono a una concentración de 40 g/L de glucosa (Fig. 8) la producción de EPS se mantuvo

constante conforme transcurrieron las horas del cultivo bacteriano pero los rendimientos fueron más bajos en comparación con los resultados obtenidos con una concentración de 20 g/L de glucosa. Esto puede deberse a que al estar disponible en el medio una mayor concentración de fuente de carbono la bacteria no sea capaz de captar los nutrientes de forma efectiva ya que puede sufrir una plasmólisis.

Los resultados anteriores de la producción de EPS nos pueden indicar que la selección de la concentración de fuente de carbono es un factor importante y debe realizarse cuidadosamente puesto que puede conducir a una disminución del crecimiento bacteriano así como de la producción del biopolímero, como fue reportado por Sutherland 1993.

4.2.3 Variación de presencia/ausencia de fosfato de sodio monobásico

La última variación que se le realizó al medio de cultivo fue la presencia o ausencia de fosfato de sodio monobásico en sus componentes, con el fin de

observar las posibles diferencias en la producción de EPS, los gráficos obtenidos respecto a estas variaciones se muestran en las figuras (Fig. 9 y Fig. 10).

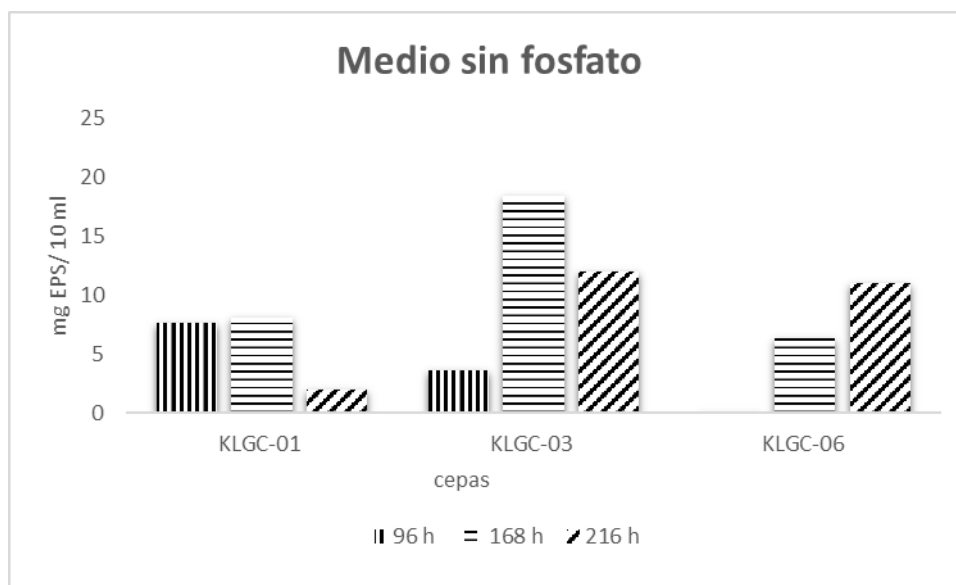


Fig. 9 Producción de EPS en ausencia de fosfato de sodio monobásico en el medio de cultivo.

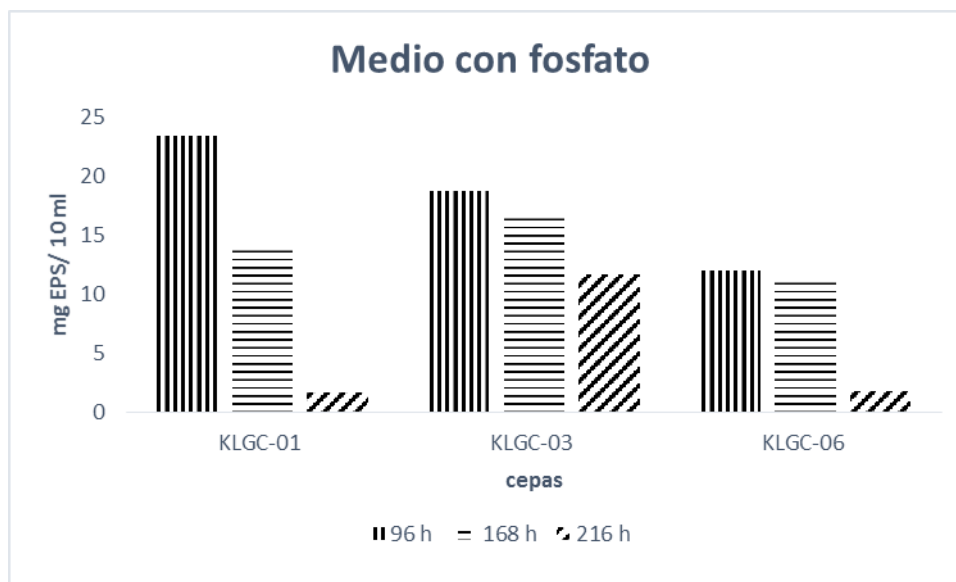


Fig. 10 Producción de EPS con presencia de fosfato de sodio monobásico (50 mM) en el medio de cultivo.

Con los resultados se evidenció que la producción de EPS responde de manera diferente en presencia y ausencia en el medio de cultivo de fosfato de sodio monobásico. La producción de EPS en ausencia de este reactivo en el medio (Fig. 9) fue muy variada en las cepas, por ejemplo, la cepa KLGC-06 presentó una producción de EPS hasta las 168 horas del cultivo bacteriano, lo cual nos puede indicar que la producción de EPS se dio a partir de que la bacteria entró a su fase estacionaria de crecimiento.

Con respecto a los resultados obtenidos en presencia de fosfato en el medio a una concentración de 50 mM (Fig. 10), se puede observar un comportamiento similar en todas las cepas, ya que todas presentan una producción de EPS decreciente, esto se puede deber a que la producción del biopolímero se dio durante la fase estacionaria de crecimiento de las bacterias y al entrar a la fase de muerte celular la producción disminuyó considerablemente a excepción de la cepa KLGC-03, donde la disminución no es tan marcada.

Con lo anterior se comprobó que una baja concentración de fosfato de sodio monobásico en el medio de cultivo influye significativamente en el crecimiento bacteriano y en la síntesis de biopolímeros. Esto concuerda con lo reportado por Mata *et al.* 2006, que nos indica que en medios con concentraciones limitantes de fosfato, se ha obtenido un mayor rendimiento de EPS y que además el fosfato ayuda a evitar una brusca fluctuación del pH en el medio de cultivo.

En las diversas variaciones realizadas en el medio de cultivo para la previa optimización de EPS también se cuantificaron las proteínas presentes en los cultivos de las cepas seleccionadas y se encontró que aunque los rendimientos de EPS son semejantes, la presencia de proteínas en los cultivos no fue análoga en todas las cepas. Por ejemplo la cuantificación de proteínas en presencia de fosfato de sodio monobásico se observa que la cepa KLGC-06 presenta una mayor cantidad de proteínas durante los primeros 7 días (Fig. 11), sin embargo

su producción de EPS es baja en comparación con la producción de las cepas KLGC-01 y KLGC-03 (Fig. 10).

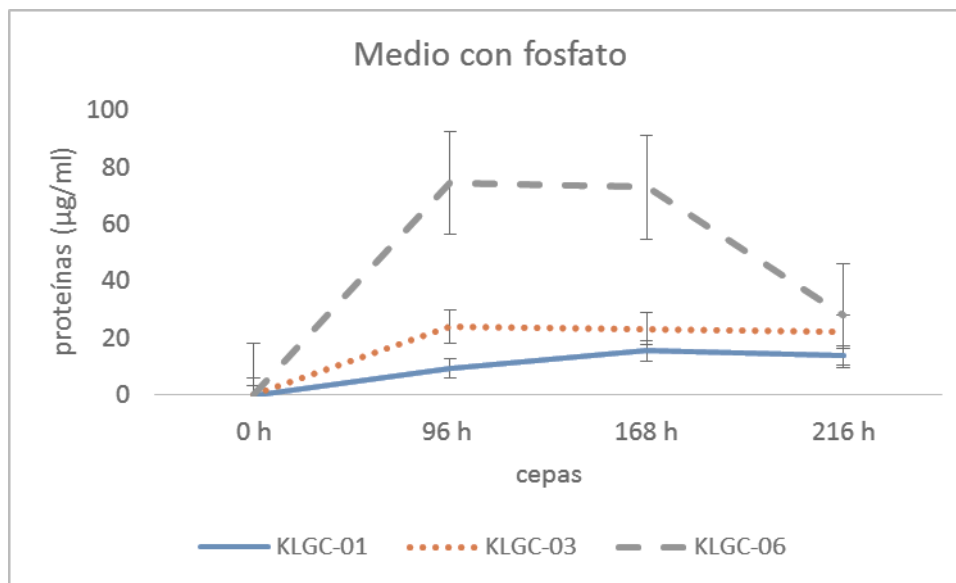


Fig. 11 Cuantificación de proteínas con presencia de fosfato de sodio monobásico en el medio de cultivo.

Por lo anterior se decidió descartar la cepa KLGC-06 y se continuó trabajando con las cepas KLGC-01 y KLGC-03, ya que estas bacterias presentaron una mayor producción de EPS aunque presentaron una baja concentración de proteínas.

Además, los resultados de todas las variaciones en el medio de cultivo sirvieron para la formulación de un nuevo medio, modificando algunos de sus

componentes y concentraciones (Tabla 7). Este nuevo medio de cultivo se utilizó para la posterior comparación de producción de EPS entre las cepas KLGC-01 y KLGC-03.

Tabla 7. Componentes del medio de cultivo modificado.

Componentes	Concentración
Glucosa	20 g/L
Extracto de levadura	1 g/L
Cloruro de calcio	0.2 g/L
Sulfato de magnesio	0.2 g/L
Fosfato de sodio monobásico	50 mM

Las cuantificaciones del EPS en todas las variaciones al medio de cultivo se realizaron por gravimetría, con lo que se observó que las muestras de EPS quedaban con un poco de humedad y esto pudo haber interferido al momento de pesarlas, por lo anterior se procedió en los siguientes experimentos a liofilizar el EPS obtenido para asegurarse de que éste estuviera libre de humedad que interfiriera en la cuantificación.

4.3 Curva de crecimiento y producción de EPS

Una vez que se realizó la selección de dos cepas psicrotolerantes productoras de EPS (KLGC-01 y KLGC-03) se procedió a comparar su crecimiento y producción de EPS (Fig.12 y Fig. 13).

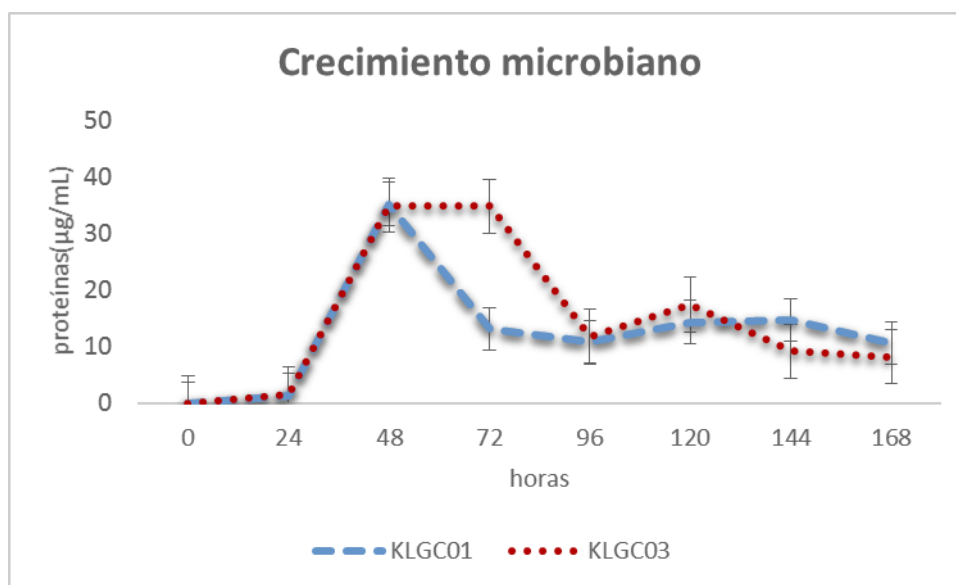


Fig. 12 Crecimiento microbiano de las cepas KLGC-01 y KLGC-03.

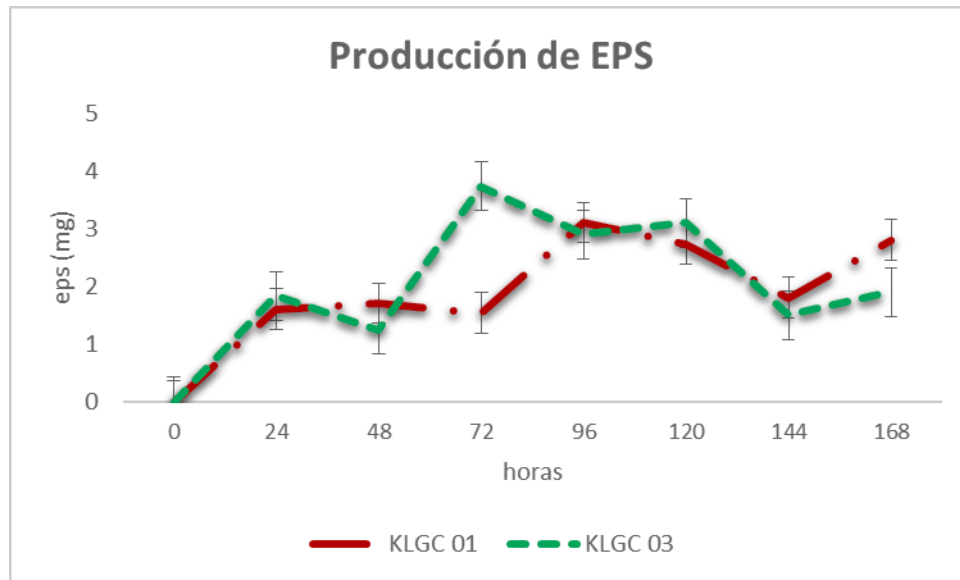


Fig. 13 Producción de EPS de las cepas KLGC-01 y KLGC-03.

Los resultados del crecimiento microbiano muestran que la cepa KLGC-03 mantiene una fase estacionaria de 48 a 72 horas, mientras que la cepa KLGC-01 muestra un aumento de proteínas a las 48 horas pero decrece a las 72 horas.

En los resultados de la producción de EPS los rendimientos que se observaron fueron muy similares, pero la bacteria KLGC-03 mostró un aumento de producción de EPS en el límite de la fase estacionaria a las 72 horas, y aunque disminuyó su producción a las 96 horas mantuvo un rendimiento considerable de EPS hasta las 120 horas, mientras que la cepa KLGC-01 mostró su mayor

rendimiento de EPS a las 96 horas pero este fue muy similar al de la cepa KLGC-03 en el mismo rango de tiempo.

La teoría nos indica que en la fase estacionaria se presenta la producción de EPS en la mayoría de las bacterias (Nichols *et al.* 2005), sin embargo en este caso la producción de EPS se logra observar desde la fase exponencial en ambas cepas, esto se le podría atribuir a que existe una relación directa de la producción del EPS asociada al crecimiento bacteriano, aunque en el caso de KLGC-03 una vez que la bacteria alcanza su fase estacionaria la producción del EPS aumenta.

4.4 Diseño de experimentos para la optimización de la producción de EPS con una fuente de carbono alternativa

Los factores y niveles del Diseño Central Compuesto (DCC) 2^3 con tres réplicas, se muestran en la Tabla 5. En total se realizaron 30 experimentos propuestos por el diseño experimental (Tabla 8).

Tabla 8. Diseño experimental de la optimización del EPS por un Diseño Central

Compuesto 2³.

Orden de corridas	Fuente de carbono (g/L)	Concentración de extracto de levadura (g/L)	Temperatura de incubación (°C)	Producción de EPS (mg/mL)
1	Glucosa	1.38	57.02	0.8
2	Glucosa	2.5	4	5.4
3	Glucosa	0	20.5	0.4
4	Glucosa	0.25	4	2.8
5	Salvado de trigo	2.5	4	48.2
6	Glucosa	3.87	20.5	2.5
7	Glucosa	2.5	37	1.8
8	Salvado de trigo	0.25	4	41.2
9	Salvado de trigo	0.25	37	49.1
10	Glucosa	2.5	4	4.4
11	Salvado de trigo	2.5	4	45.6
12	Glucosa	2.5	37	3.4
13	Salvado de trigo	2.5	37	61.6
14	Glucosa	2.5	37	2.1
15	Glucosa	0.25	37	1.9
16	Glucosa	0.25	37	2.4
17	Salvado de trigo	2.5	4	39.7
18	Salvado de trigo	2.5	37	53.7
19	Salvado de trigo	0.25	4	49.7
20	Salvado de trigo	0.25	4	38.7
21	Salvado de trigo	1.38	20.5	37.5
22	Salvado de trigo	0.25	37	44.8
23	Salvado de trigo	0.25	37	48.3
24	Glucosa	1.38	20.5	2.3
25	Glucosa	0.25	4	4.4
26	Glucosa	2.5	4	5.9
27	Glucosa	0.25	37	3.9
28	Glucosa	1.38	0	0.9
29	Glucosa	0.25	4	3.9
30	Salvado de trigo	2.5	37	51.6

El análisis de los datos del diseño de experimentos se realizó con el programa Design expert 7.0.0 dando como resultado un modelo cuadrático significativo en el ANOVA para superficie de respuesta cuadrática para la optimización de EPS, siendo el factor A (fuente de carbono) el más significativo con un valor p de <0.0001 Tabla 9.

Tabla 9. Análisis de varianza para el modelo de superficie de respuesta cuadrática para la optimización de la producción de EPS.

Fuente	df	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F-value	P-value
Modelo	13238.39	9	1470.93	18.22	<0.0001
A-fuente de carbono	1	10930.64	10930.64	135.42	<0.0001
B-Concentración de Ext. lev	1	40.39	40.39	0.5	0.4875
C-Temp. De incubación	1	35.17	35.17	0.44	0.5167
AB	1	25.83	25.83	0.32	0.5779
AC	1	136.8	136.8	1.69	0.2078
BC	1	9.75	9.75	0.12	0.7318
A ²	1	690.58	690.58	8.56	0.0084
B ²	1	1627.91	1627.91	20.17	0.0002
C ²	1	1665.04	1665.04	20.63	0.0002
Residual	20	1614.36	80.72		
Lack of Fit	4	1437.73	359.43	32.56	<0.0001
Pure Error	16	176.63	11.04		
Total	29	14852.75			

P< 0.05 es significativa

Con relación a las gráficas de superficies de respuesta se obtuvieron las condiciones óptimas para la producción del EPS las cuales fueron: en la fuente de carbono el salvado de trigo, en la concentración de extracto de levadura fue de $1.38 \text{ g/L} \pm 0.5$ y una temperatura de incubación de $20.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 8.2$.

La producción de EPS incrementó con una fuente de carbono más compleja, el salvado de trigo. Esto podría deberse a la composición química del sustrato, ya que este está compuesto por las capas externas del grano de trigo como lo son: el pericarpio, con sus tres subcapas (epicarpio, mesocarpio y endocarpio) que son ricas en fibras y minerales (magnesio, zinc y potasio); la testa, rica en vitaminas (K, B5, B3) y enzimas; y la capa de aleurona rica en proteínas y grasas (Prinsen 2010). Estos micronutrientes presentes en el salvado de trigo pudieron haber favorecido el crecimiento de la bacteria, por ello y además por su contenido de carbohidratos (21.72 g de carbohidratos en 100 g de salvado de trigo) la producción de EPS pudo haberse incrementado, logrando alcanzar rendimientos de entre 38.7 mg a 61.6 mg con esta fuente de carbono alternativa,

que comparados con los rendimientos obtenidos con glucosa como fuente de carbono, los cuales fueron de entre 0.8 mg a 5.9 mg, se consiguió que la producción del EPS aumentara 10 veces aproximadamente. Con estos resultados de rendimiento de EPS, se redujeron los costos de producción, puesto que el salvado de trigo tiene un menor precio comparado con el precio de la glucosa, además de que también es fácil de conseguir.

En relación a la concentración del extracto de levadura como fuente de nitrógeno, los resultados obtenidos confirman lo anteriormente descrito en la sección 3.2.1, con respecto a que el exceso de esta fuente puede disminuir los rendimientos de EPS. Por lo que la concentración de extracto de levadura que se manejaba en el medio de cultivo (Tabla 7) no varió significativamente con respecto a la óptima dada por el diseño DCC 2³ que fue de 1.38 ± 0.5 g/L.

Por último la temperatura de incubación óptima dada por el DCC 2³ fue de 20.5 ± 8.2 °C, lo cual indica que aunque la bacteria productora de EPS sea capaz de desarrollarse a una baja temperatura (4 °C), la temperatura en la que la

producción de EPS aumenta es entre 20 °C y 28 °C, con lo cual se da una reducción en los costos de producción, ya que se pueden utilizar incubadoras que no necesitan de sistemas de enfriamiento.

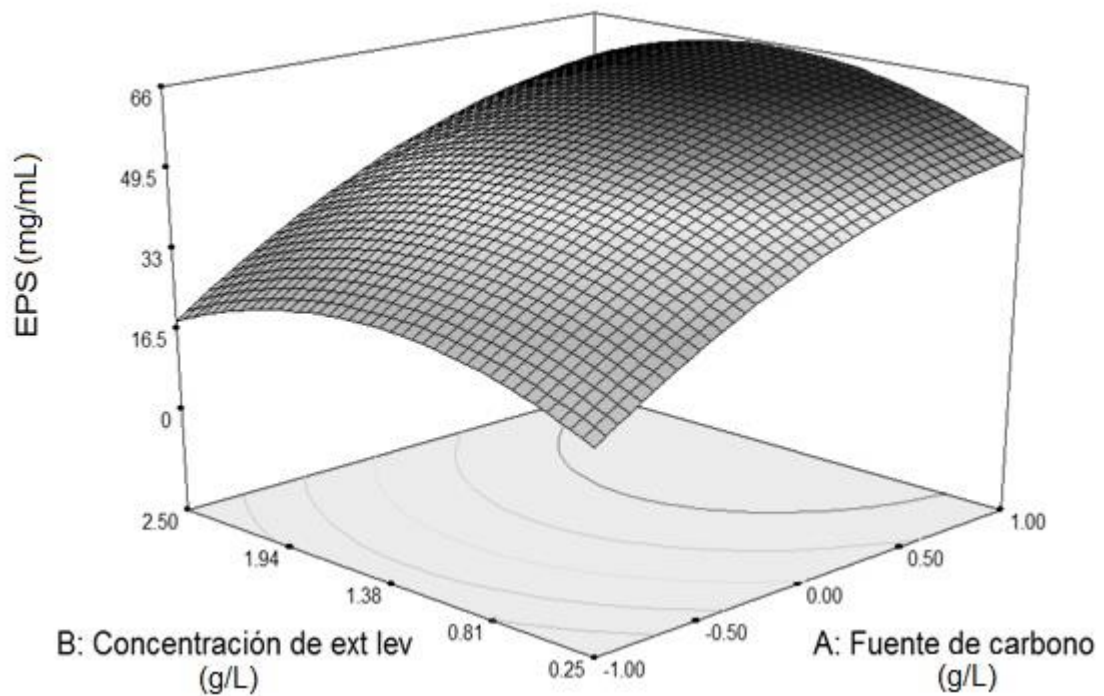


Fig. 14 Gráfica de superficie de respuesta de fuente de carbono vs concentración del extracto de levadura.

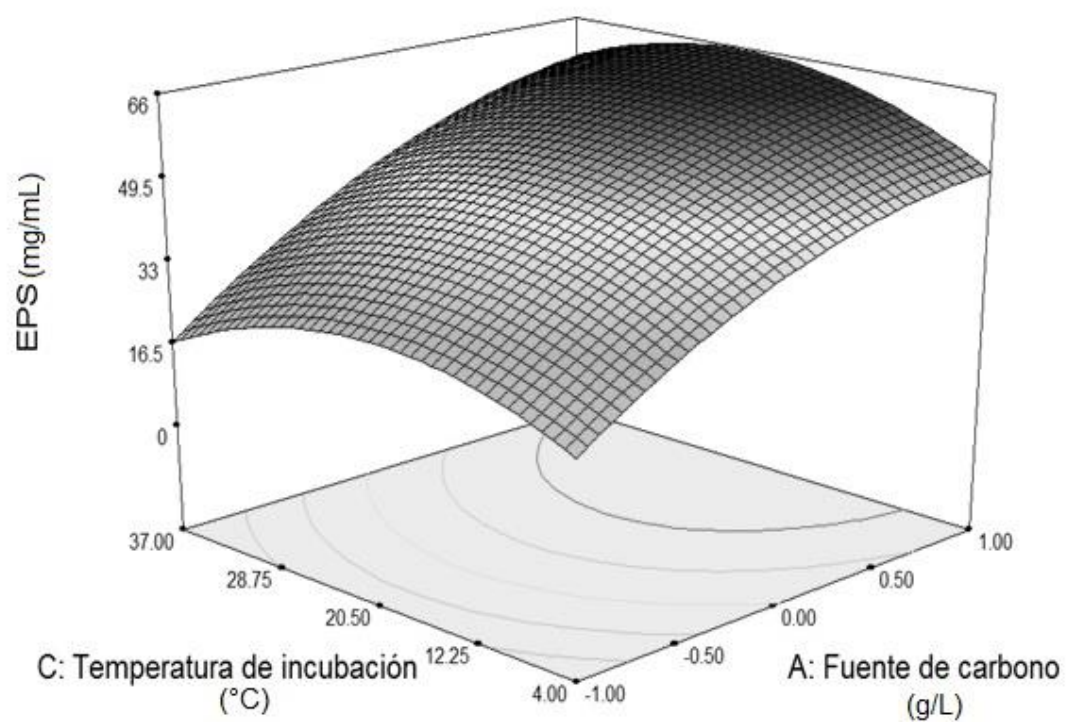


Fig. 15 Gráfica de superficie de respuesta de fuente de carbono vs temperatura de incubación.

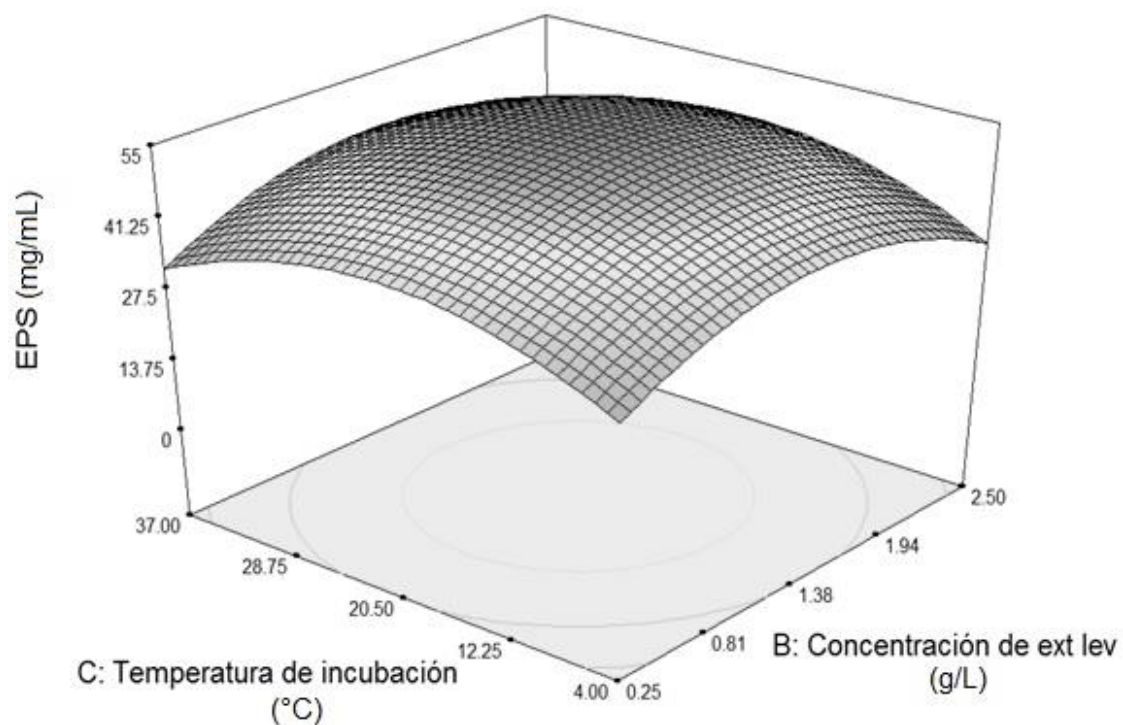


Fig. 16 Gráfica de superficie de respuesta de concentración del extracto de levadura vs temperatura de incubación.

4.5 Cromatografía en capa fina (TLC)

El cromatograma obtenido se muestra en la Fig. 17 y en la Tabla 10 se muestran los R_f de los azúcares estándares, así como también los componentes del EPS hidrolizado.

$R_f = (\text{Distancia recorrida por el compuesto} / \text{Distancia recorrida por el solvente})$

Distancia recorrida por el solvente 7.45 cm

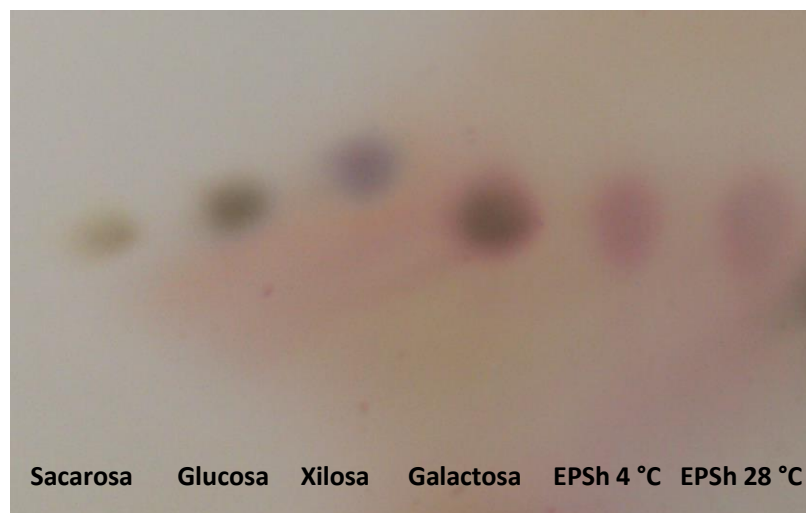


Fig. 17 Cromatografía en capa fina de los estándares de azúcar y las muestras del EPS hidrolizado producido a 4°C y 28°C.

Tabla 10. Comparación de los Rf de estándares con los hidrolizados del EPS.

Compuesto	Distancia recorrida (cm)	Rf
Glucosa	4.0	0.5369
Sacarosa	3.6	0.4832
Xilosa	4.5	0.6040
Galactosa	3.8	0.5100
EPS 4 °C	4.0	0.5369
EPS 28 °C	4.0	0.5369

En el cromatograma se logra observar una sola mancha en las muestras de los EPS hidrolizados y al comparar el Rf de ambos EPS hidrolizados éste coincidió con el Rf del estándar de glucosa, lo que nos indicó que el principal monosacárido que conforma al EPS producido por la bacteria psicrotolerante se trata de glucosa.

4.6 Análisis colorimétricos

El contenido de carbohidratos, proteínas y ácidos urónicos se resume en la Tabla 11. Los resultados mostrados corresponden a la media de tres determinaciones y están expresados en porcentaje en función de la concentración empleada del EPS (1 mg/mL).

Tabla 11. Composición química del EPS obtenido en condiciones óptimas.

EPS	Carbohidratos	Proteínas	Ácidos urónicos
	%	%	%
EPS 4 °C	43.14	1.4	18.13
EPS 28 °C	32.39	1.5	24.97

Las diferencias que se presentan en el contenido de carbohidratos muestran que el EPS producido a 4 °C tiene un mayor porcentaje (43.14 %) con respecto al EPS producido a 28 °C (32.39 %), esto puede deberse a que la bacteria sufre un mayor estrés a bajas temperaturas y necesita protegerse recurriendo al EPS para evitar su congelamiento y lograr su supervivencia.

El contenido de ácidos urónicos en el EPS producido a 4 °C es menor (18.13 %) con respecto al EPS producido a 28 °C (24.97 %), sin embargo la presencia de este monómero en ambos EPS pueden darles un estado polianiónico, lo cual nos indica que puede llegar a captar metales pesados ayudando en la biorremediación ambiental, ya que las uniones de los metales pesados con los EPS se da mediante interacciones electrostáticas con grupos funcionales con carga negativa, los EPS son capaces de retener iones metálicos de naturaleza ácida, siendo los principales responsables de estas interacciones los grupos carboxilos de los ácidos urónicos (Mata *et al.* 2006).

En ambos EPS se encontró la presencia de proteínas con porcentajes muy semejantes (1.4 % y 1.5 %). Su contenido proteico en los EPS podría brindarles actividad emulsionante, ya que se han encontrado complejos de heteropolisacáridos aniónicos unidos a proteínas, como el emulsano RAG-1, que presentan una alta actividad emulsionante (Toren *et al.* 2002, Rosenberg *et al.* 1979).

4.7 Análisis del exopolisacárido por FT-IR

Los espectros FT-IR obtenidos de los EPS producidos a 4 °C y 28 °C para identificar los grupos funcionales presentes en el biopolímero se muestran en la siguiente figura (Fig. 18).

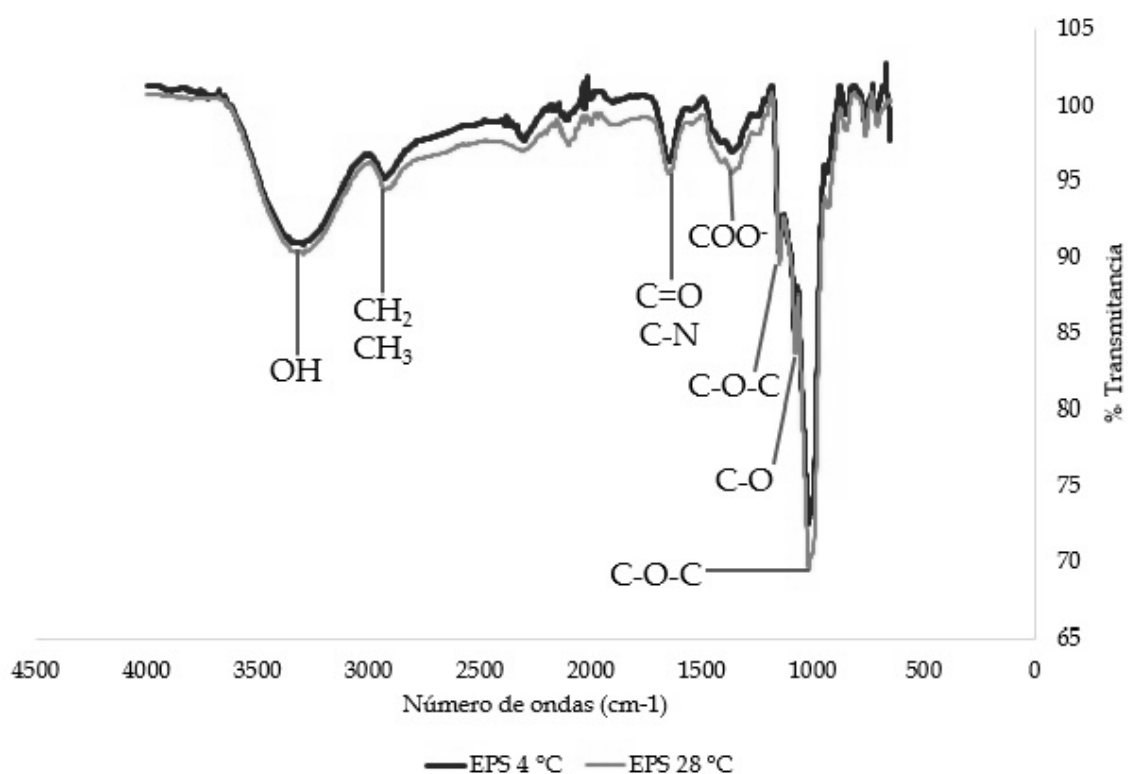


Fig. 18 Espectros FT-IR de EPS producido a 4 °C y 28 °C.

Las bandas de mayor intensidad y anchura se presentan a 3298 cm^{-1} , lo cual corresponde a un estiramiento de un grupo OH asimétrico característico en la mayoría de las gomas procedentes de microorganismos; la banda a 2921 cm^{-1} corresponde a los grupos $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$. La banda 1644 cm^{-1} corresponde a $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}-\text{N}$ correspondientes a las flexiones de proteínas y péptidos amida. En la banda 1380 cm^{-1} se observa el estiramiento de COO^- lo que indica la presencia de los ácidos urónicos. En la región de la “huella dactilar”, 1152 cm^{-1} , 1081 cm^{-1}

y 1020 cm^{-1} , corresponden a las vibraciones de las uniones -C-O-C- de la glucosa. (Bosch *et al.* 2006; Baker *et al.* 2010, Manni & Santiago 2008)

En los espectros realizados al EPS producido a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observó la presencia de los mismos grupos funcionales, con lo que se concluyó que la temperatura de producción no afectaba dichos grupos presentes en los EPS, sin embargo, con el resultado del análisis colorimétrico de la sección anterior, se puede apreciar que en los porcentajes de estos grupos funcionales si se presentaron algunas diferencias cuando se varió la temperatura de producción de los EPS.

4.8 Análisis del exopolisacárido por RMN

En las figuras 19 y 20 se presentan los espectros de ^1H RMN obtenidos de los EPS producidos a las diferentes temperaturas de producción (4°C y $28\text{ }^{\circ}\text{C}$), disueltos en D_2O para asegurar la absorción de los grupos CH, en particular sobre el del carbono anomérico.

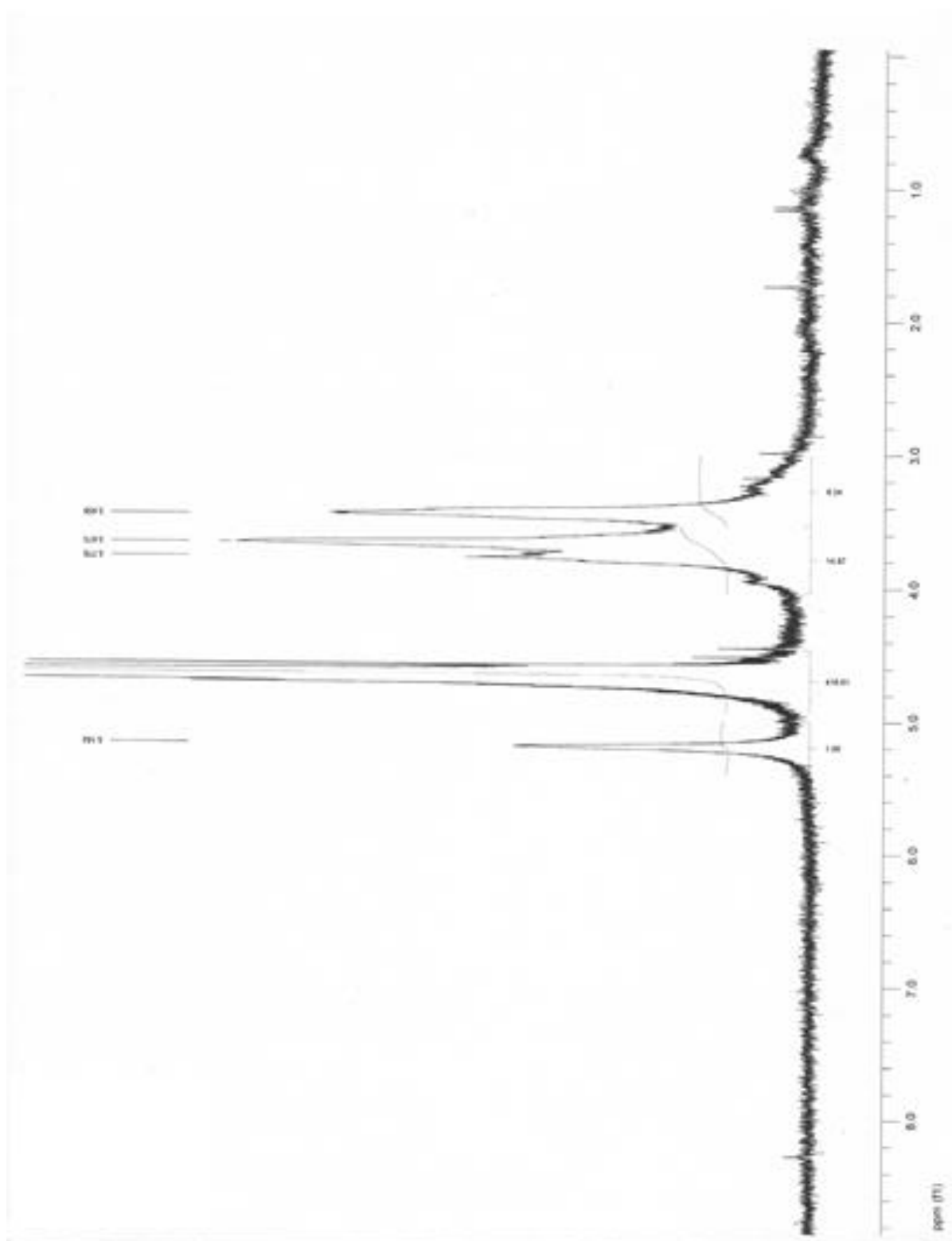


Fig. 19 Espectro de ^1H RMN de EPS producido a 4 °C.

Los espectros de ^1H RNM de los EPS producidos a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y $28\text{ }^\circ\text{C}$ presentaron una analogía en sus señales, en donde el correspondiente protón ecuatorial del anómero α aparece a 5.1 ppm en el EPS producido a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y a 5.2 ppm en el EPS producido a $28\text{ }^\circ\text{C}$, estas señales coinciden con lo reportado por la literatura para los carbonos anómicos α de la glucosa (Weininger, S.J.1988).

La constante de acoplamiento, que está relacionada con el ángulo diedro entre dos protones vecinos, nos indicó en ambos espectros que se trataba de un acoplamiento axial-ecuatorial correspondiente a la forma α , por lo que el EPS podría presentar enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$ o $\alpha(1\rightarrow6)$.

Las señales que se presentaron entre 4.6 ppm y 4.8 ppm se deben a la formación del proceso de intercambio que convierte OH en OD dando lugar a HDO, esto se debe al disolvente empleado (D_2O) ya que todos los grupos OH de la glucosa se convierten en grupos OD formando un intenso singlete.

Con el análisis de ambos espectros ^1H RNM se concluyó que la estructura del EPS no presentaba cambios, independientemente de la temperatura a la que fuera producido.

Estos resultados, aunados a los obtenidos en los espectros FT-IR, nos indicaron que entre el EPS producido a 4 °C y a 28 °C no existían diferencias en sus grupos funcionales y estructura, por lo que se llegó a la conclusión de que la bacteria psicotolerante producía el mismo biopolímero a diferentes temperaturas, sin embargo, dependiendo del estrés que sufriera la bacteria en las distintas temperaturas de incubación si se presentó una variación en los porcentajes de sus componentes.

4.9 Estudio de los efectos del exopolisacárido

4.9.1 Efecto de crioprotección

Se emplearon para el estudio del efecto de crioprotección del EPS tres microorganismos como se menciona en la sección 3.8.1. y los resultados que se obtuvieron después de someterlos a siete ciclos de congelamiento/deshielo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 12. Prueba de crioprotección (viabilidad de los microorganismos después de 7 ciclos de congelamiento/deshielo).

Microorganismo	EPS	Agua	Glicerol
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	++	+	+++
Levadura KLGC-03	++	+	++
KLGC-03	+++	+	+++

La morfología de los microorganismos después del primer ciclo de congelamiento/deshielo se muestra en la Fig. 21 y la morfología del séptimo ciclo de congelamiento/deshielo se muestra en la Fig. 22.

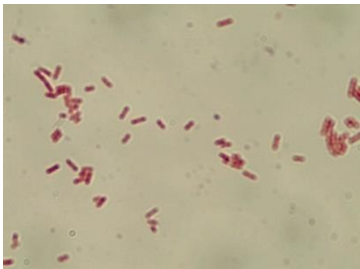
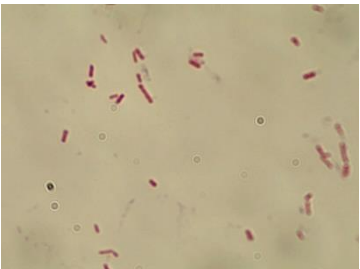
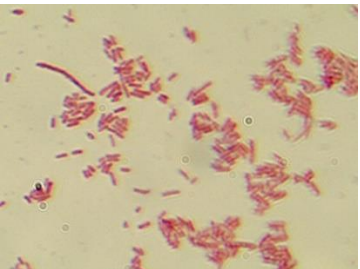
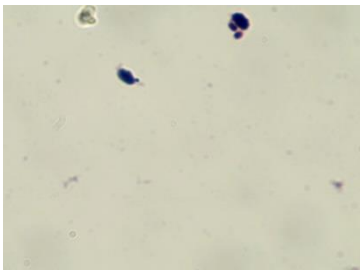
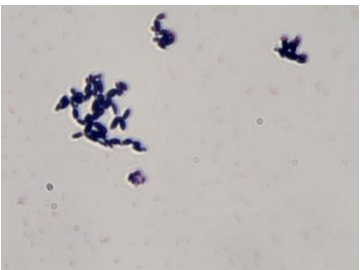

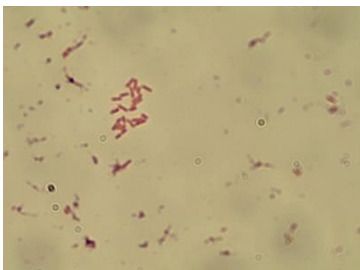
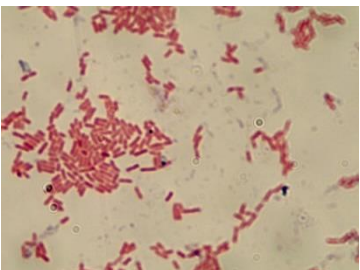
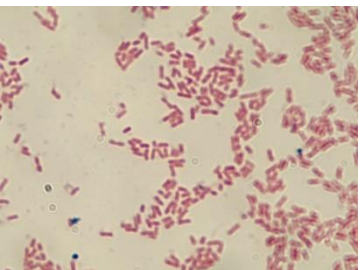
<p><i>E.coli</i> ATCC 11229 en</p> <p>agua</p> 	<p><i>E. coli</i> ATCC 11229 en</p> <p>glicerol</p> 	<p><i>E. coli</i> ATCC 11229 en</p> <p>EPS</p> 
<p>Levadura KLGC-03 en</p> <p>agua</p> 	<p>Levadura KLGC-03 en</p> <p>glicerol</p> 	<p>Levadura KLGC-03 en</p> <p>EPS</p> 
<p>KLGC-03 en agua</p> 	<p>KLGC-03 en glicerol</p> 	<p>KLGC-03 en EPS</p> 

Fig. 21 Morfología de los microorganismos empleados en la prueba de crioprotección después del primer ciclo de congelamiento/deshielo.

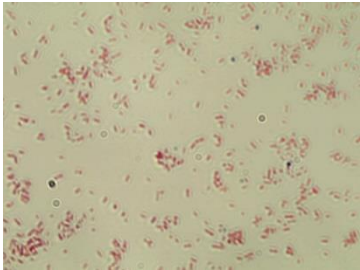


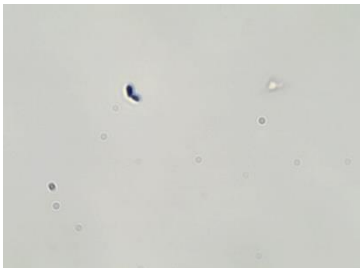
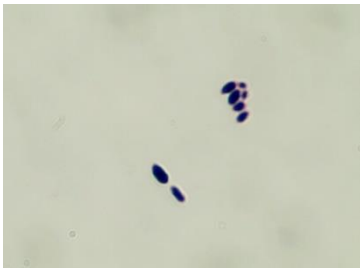
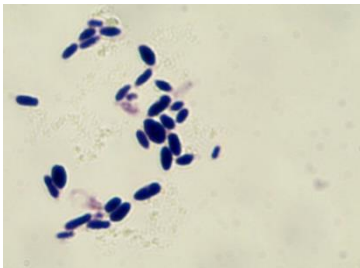
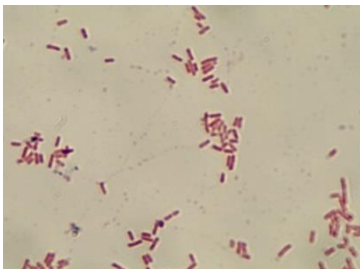
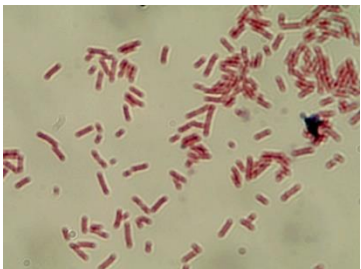

<p><i>E.coli</i> ATCC 11229 en</p> <p>agua</p> 	<p><i>E. coli</i> ATCC 11229 en</p> <p>glicerol</p> 	<p><i>E. coli</i> ATCC 11229 en</p> <p>EPS</p> 
<p>Levadura KLGC-03 en</p> <p>agua</p> 	<p>Levadura KLGC-03 en</p> <p>glicerol</p> 	<p>Levadura KLGC-03 en</p> <p>EPS</p> 
<p>KLGC-03 en agua</p> 	<p>KLGC-03 en glicerol</p> 	<p>KLGC-03 en EPS</p> 

Fig. 22 Morfología de los microorganismos empleados en la prueba de crioprotección después del séptimo ciclo de congelamiento/deshielo.

En el primer ciclo de congelamiento/deshielo (Fig. 21) no se observó ningún cambio morfológico en los microorganismos empleados para esta prueba, todos conservaron sus células de forma semejante en glicerol, agua y el EPS, por lo que se procedió a realizar los ciclos de congelamiento/deshielo hasta que se observó un cambio en las células, que este caso fue hasta el séptimo ciclo.

Los cambios morfológicos en la cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229 al séptimo ciclo de reactivación (Fig. 22) fueron los siguientes: en agua disminuyó el tamaño de las células bacterianas, aunque el número de células no se vio afectado por completo. En glicerol la cepa conservó su tamaño y número de células. Y en el EPS disminuyó el número de células, sin embargo su tamaño se conservó muy similar al que presentó en la reactivación procedente del glicerol.

Los cambios morfológicos que sufrió la levadura empleada para esta prueba de crioprotección al séptimo ciclo de reactivación (Fig. 22) fueron: en agua tuvo un crecimiento escaso y sus células disminuyeron notablemente en

comparación con el primer ciclo. En glicerol disminuyó el número de células pero el tamaño se conservó como en el primer ciclo. En EPS se observó que el tamaño de las células no se vio afectado, pero el número de células fue mayor en comparación con el conservado en glicerol.

Por último los cambios morfológicos en la cepa KLGC-03 en el séptimo ciclo de reactivación (Fig. 22) fueron: en agua no se observan cambios en el tamaño y número de células en comparación con el primer ciclo, sin embargo se observan cúmulos morados, los cuales podrían formar parte del EPS producido por dicha bacteria. En glicerol la cepa se conservó adecuadamente, ya que no se observaron variaciones en el tamaño y número de células. El tamaño y el número de células reactivadas de EPS no sufrieron cambios, y se observó una conservación de la cepa muy similar a la presentada en glicerol.

Los microorganismos empleados para evaluar este efecto conservaron su morfología y fueron viables al preservarlos en EPS al igual que en los conservados en glicerol. Estos resultados nos indicaron que el EPS producido

por la bacteria psicrotolerante puede llegar a ser utilizado como un crioprotector, ya que su capacidad para preservar microorganismos fue similar a la capacidad preservadora presentada por el glicerol.

El EPS producido entra en la clasificación de los crioprotectores no penetrantes, ya que está constituido principalmente de monómeros de glucosa (sección 4.5), y el glicerol entra en la clasificación de crioprotectores penetrantes, sin embargo, tanto el EPS como el glicerol generaron resultados semejantes en cuestión de la criopreservación aunque no entren en la misma clasificación de preservantes.

Con esta prueba de crioprotección también se puede confirmar que el EPS no resulta ser dañino para otros microorganismos, por esto y por la capacidad crioprotectora que presentó, el EPS producido por la bacteria psicrotolerante puede llegar a ser empleado como un criopreservante efectivo a nivel industrial o como un asociado a un agente penetrante.

4.9.2 Efecto de actividad antioxidante

En los resultados para la evaluación de la actividad antioxidante se obtuvo el porcentaje del secuestro de radicales libres (% RSA) del EPS y del ácido ascórbico. Sin embargo, los porcentajes de RSA para el EPS fueron muy bajos en comparación con los del ácido ascórbico, el cual tiene propiedades antioxidantes altas, como se observa en la Fig. 23. Esto se le puede atribuir a que la bacteria no produjo un EPS con propiedades antioxidantes por lo que el EPS producido presentó muy bajos porcentajes del secuestro de radicales libres.

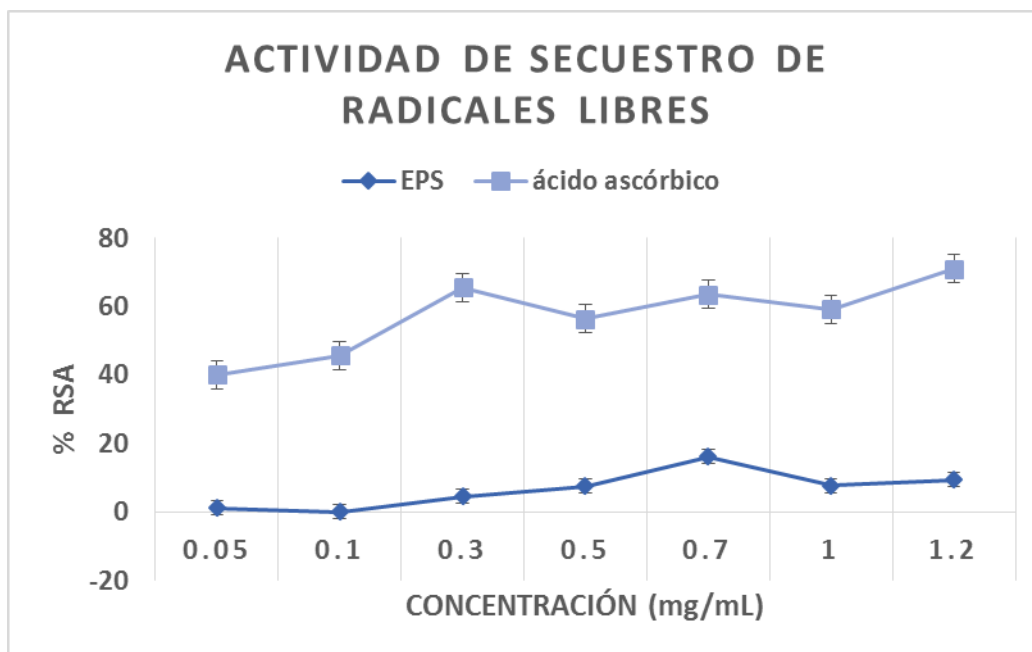


Fig. 23 Evaluación del secuestro de radicales libres (% RSA) del EPS.

4.9.3 Efecto antimicrobiano

Los diámetros de los halos de inhibición de los antibióticos y los antibióticos adicionados con EPS en *Escherichia coli* ATCC 11229 se muestran en la siguiente Tabla.

Tabla 13. Diámetro de halos de inhibición en *Escherichia coli* ATCC 11229.

Antibiótico	Diámetro del halo (mm)
Ampicilina	-
Kanamicina	9.1
Amikacina	20.8
Ampicilina + EPS	-
Kanamicina +EPS	10.5
Amikacina + EPS	21.2

Los resultados de esta prueba nos mostraron que no hubo diferencia entre los diámetros de inhibición de antibióticos y antibióticos con EPS, por lo que el EPS no presenta la propiedad antimicrobiana y tampoco presenta la capacidad de potenciar el efecto de los antibióticos. Esto se puede deber a que la bacteria no sintetiza exopolisacáridos con propiedades antimicrobianas y esté solo actúa como protector en ambientes extremos, pero no le brinda a la bacteria la capacidad de eliminar a otros microorganismos.

4.10 Identificación de la bacteria psicrotolerante productora de exopolisacárido

Las características morfológicas que presentan las colonias de la bacteria KLGC-03 son de forma circular de elevación convexa con borde entero. Además su consistencia era mucoide (viscosa) y su superficie brillante.

Mediante la tinción Gram se observaron bacilos Gram negativos (Fig. 24).

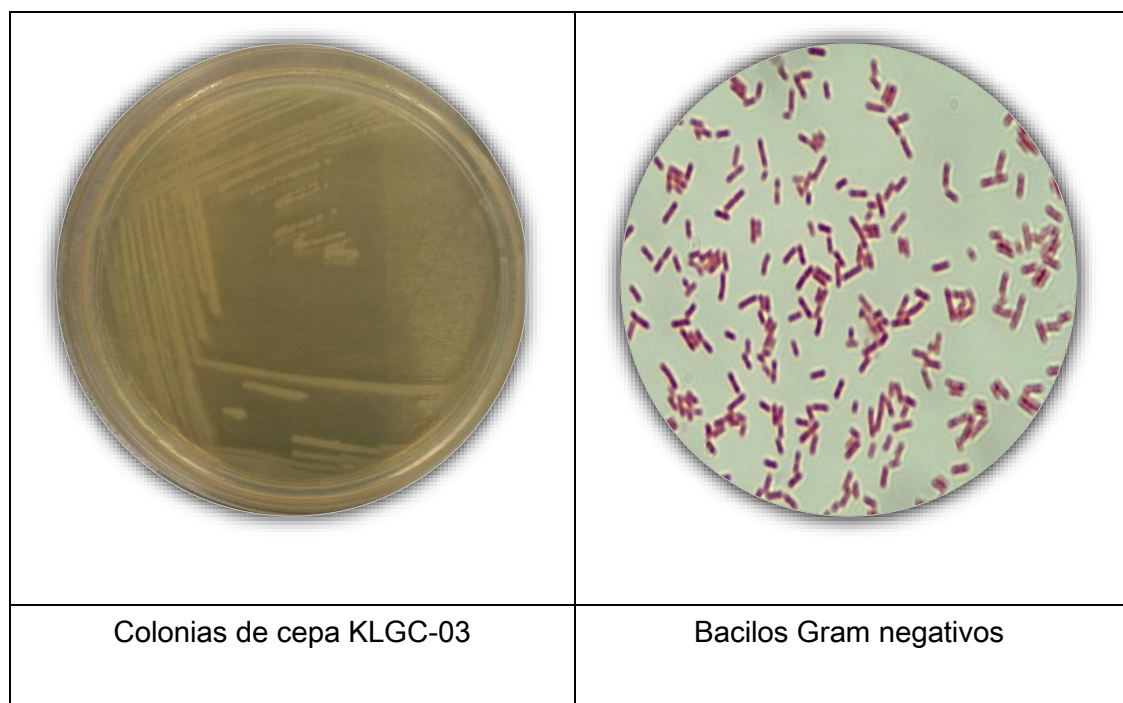


Fig. 24 Colonias y tinción Gram de bacteria KLGC-03.

Los resultados de las pruebas bioquímicas que se efectuaron para la identificación del microorganismos se muestran en la Tabla 14, con ayuda de estas pruebas y desarrollándose el crecimiento característico de las colonias en agar EMB, nos indicó que posiblemente se trataba de *Escherichia coli*.

Esto se corroboró mediante los sistemas de identificación API 20E (Fig. 25), con el cual se confirmó que la cepa KLGC-03 productora de EPS es *Escherichia coli* (Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 9ª. Edición).



Fig. 25 Sistema de identificación API 20E empelado para la caracterización de la cepa KLGC-03.

Tabla 14. Resultados de pruebas bioquímicas en cepa KLGC-03 y *E.coli* ATCC 11229.

Prueba	KLGC-03	<i>E.coli</i> ATCC 11229
Gram	-	-
Indol	+	+
Rojo de Metilo	+	+
Voges Proskauer	-	-
Citrato	-	-
Producción de H ₂ S	-	-
Urea	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-
Ornitina descarboxilasa	+	+
Motilidad	+/-	+/-
Hidrolisis de gelatina	-	-
Producción ácida, D-glucosa	+	+
Producción de gas, D-glucosa	+	
Producción ácida, L-arabinosa	+	+
Myo-inositol	-	-
Lactosa	+	
D-Manitol	+	+
Melibiosa	+	+
L-Ramnosa	+	+
D-Sorbitol	+	+
Sacarosa	+	-
ONPG	+	+
Oxidasa	-	-
Pigmento	-	-

Diferentes estudios han reportado la existencia de un tipo de cápsulas, que están abundantemente distribuidas entre las enterobacterias (Sledjeski & Gottesman 1996) conocidas como ácido colánico. Este biopolímero que se presenta en algunas cepas de *Escherichia coli*, está formado por monómeros de fucosa, glucosa, galactosa, ácidos glucurónicos, que constituyen aproximadamente el 90% de su peso además de un grupo O-acetil, y una molécula de piruvato. A este biopolímero se le han dado aplicación en algunos productos cosméticos y artículos de cuidado personal (Stevenson *et al.* 1996; Hanna *et al.* 2003; JB Prajapat 2013).

También se ha reportado ya que las cápsulas de *E. coli* están formadas por polisacáridos de alto peso molecular y se encuentran firmemente ancladas a la superficie celular. Aunque las cepas relacionadas con este tipo de cápsulas generalmente son consideradas como patógenas (Corbett & Roberts 2008).

Asimismo, se han diferenciado cuatro grupos de cápsulas polisacarídicas en *E. coli*, esta clasificación está basada exclusivamente en criterios biosintéticos

y genéticos, eliminando la dependencia de denominaciones serológicas y el uso de estructuras polisacáridicas como elemento predictivo (Whitfield y Roberts, 1999).

El EPS con el cual se trabajó en este proyecto se encontró que está constituido principalmente de monómeros de glucosa y ácido glucurónico, de tal forma que al compararlo con la composición que presenta el ácido colánico, no se trataba del mismo biopolímero, ya que el ácido colánico presenta un mayor número de monómeros que conforman su estructura.

Sin embargo el EPS producido por la bacteria psicrotolerante identificada como *E. coli* podría entrar en la clasificación de cápsulas del grupo 1 presentes en *E. coli*, ya que estas son polisacáridos ácidos que normalmente contienen ácidos urónicos, y con una tendencia a ser similares en su estructura. Y esto podría asemejarse con los resultados obtenidos en la evaluación de la composición y estructura del EPS producido. Algunas cápsulas similares han sido encontradas en otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae* (Whitfield 2006).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Los resultados desplegados y lo anteriormente discutido permite concluir lo siguiente:

Se logró identificar a la bacteria psicrotolerante productora de exopolisacárido como *Escherichia coli*. Esta bacteria pudo haber experimentado por todos los cambios morfológicos para conseguir adaptarse a los cambios de temperaturas que se presentan en el entorno de donde fue aislada.

La optimización de la producción del EPS, nos indicó las condiciones adecuadas para aumentar los rendimientos del EPS (50% aprox.) las cuales fueron: en la fuente de carbono el salvado de trigo, en la concentración de extracto de levadura fue de $1.38 \text{ g/L} \pm 0.5$ y una temperatura de incubación de $20.5 \text{ °C} \pm 8.2$.

La composición del exopolisacárido producido por la bacteria psicrotolerante fue principalmente de monómeros de glucosa y ácido glucurónico.

Además presentó también una fracción proteica.

Con los espectros FT-IR y de ^1H RMN, aunados a los análisis colorimétricos, se confirmó que el EPS producido a 4 °C y 28 °C presentaban los mismos grupos funcionales y que la conformación de su estructura también podía asemejarse.

La temperatura de su producción no afecta su composición y estructura, sin embargo, si hay una pequeña variación en los porcentajes de sus componentes.

A 28 °C se obtuvieron mayores rendimientos de EPS y esto aporta una disminución de costos de producción.

Dentro de los efectos evaluados para el EPS, el más prometedor fue el de la propiedad crioprotectora, ya que puede llegar a emplearse como criopreservante no penetrante.

Algunas de las posibles aplicaciones industriales del EPS se encuentran relacionadas principalmente a sus posibles características emulsionantes y espumantes, dadas por la presencia de proteínas en su composición. Además puede ser utilizado en la biorremediación ambiental removiendo metales pesados o especies catiónicas, ya que puede llegar a tener una carga aniónica por su contenido de ácidos urónicos.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS

La perspectiva principal del proyecto es la continuación del estudio del EPS como agente criopreservante, empleando temperaturas más bajas y con diferentes microorganismos, para comercializarlo industrialmente como el glicerol.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, M.G., Lalonde, S.V., Konhauser, K.O., Foght, J.M. 2010. Role of extracellular polymeric substances in the surface chemical reactivity of *hymenobacter aerophilus*, a psychrotolerant bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), pp.102–109.
- Blumenkrantz, N., Asboe Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), pp.484–489.
- Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann, D., Yantorno, O. 2006. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(5), pp.736–747.
- Bravo, L., Salazar, D., Arce, M., García, H., Ramírez, M., Cabrera, E., Fernández, A., Castañeda, N. 2005. Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas en animales domésticos y afectivos. *Revista Electrónica Veterinaria REVET*, 6(11): pp.29-33.
- Brune, A. 2013. *The Prokaryotes*. , 192, pp.545–577.
- Carrión, O., Delgado, L., Mercade, E. 2015. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from *Antarctic Pseudomonas sp.* ID1. *Carbohydrate Polymers*, 117, pp.1028–1034.
- Cayol, J.L., Ollivier, B., Alazard, D., Amils, R., Godfroy, A., Piette, F., Prieur, D. 2015. *The Extreme Conditions of Life on the Planet and Exobiology. Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications.* Springer Netherlands, pp. 353-394.

- Corbett, D., Roberts, I.S. 2008. Capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. Adv Appl Microbiol 65: pp.1-26.
- Di Pippo, F., Ellwood, N., Gismondi, A., Bruno, L., Rossi, F., Magni, P., De Philippis, R. 2013. Characterization of exopolysaccharides produced by seven biofilm-forming *cyanobacterial* strains for biotechnological applications. Journal of Applied Phycology, 25(6), pp.1697–1708.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Schorr-Galindo, S. 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydrate Polymers, 87(2), pp.951–962.
- Finore, I., Di Donato, P., Mastascusa, V., Nicolaus, B., Poli, A. 2014. Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. Marine Drugs, 12(5), pp.3005–3024.
- Freitas, F., Alves, V.D., Reis, M. 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. Trends in Biotechnology, 29(8), pp.388–398.
- Freitas, F., Alves, V. D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira, R., Reis, M. 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. Bioresource Technology, 100(2), pp.859–865.
- Hanna, A., Berg, M., Stout, V., Razatos, A. 2003. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 69: pp.4474-4481.
- Helmke, E., Weyland, H. 2004. Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. Cellular and molecular biology, 50(5), pp.553–561.

- Holt, J.G. 1994. Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 9^a. Edición ,Baltimore, Maryland, USA.
- Hoover, R.B., Pikuta, E.V. 2009. Psychrophilic and Psychrotolerant Microbial Extremophiles in Polar Environments. In A. K. Bej, J. M. Aislabie, & R. M. Atlas, eds. Polar Microbiology: The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments.
- Jagannadham, M.V., Chattopadhyay, M.K., Subbalakshmi, C., Vairamani, M., Narayanan, K., Rao, C.M., Shivaji, S. 2000. Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum*. Archives of Microbiology, 173(5-6), pp.418–424.
- Kim, S.J., Yim, J.H. 2007. Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the Antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653. Journal of microbiology, 45(6), pp.510–514.
- Kumar, A.S., Mody, K., Jha, B. 2007. Bacterial exopolysaccharides - A perception. Journal of Basic Microbiology, 47(2), pp.103–117.
- Mancuso-Nichols, C.A., Guezennec, J., Bowman, J.P. 2005. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the Southern Ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: A review. Marine Biotechnology, 7(4), pp.253–271.
- Manni, D., Santiago, L. 2008. Desarrollo de biomateriales a partir de almidón de amaranto modificado. Asociación Argentina de Materiales, (1), pp.16–17.
- Margesin, R., Miteva, V., 2008. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms, Springer Berlin Heidelberg ,162: pp.346-361.
- Mata, J.A., Béjar, V., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M.C., Quesada, E., Llamas, I. 2008. Characterization of exopolysaccharides produced by three

- moderately halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae*.
Journal of Applied Microbiology, 105(2), pp.521–528.
- Mata, J.A., Béjar, V. Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C., Quesada, E.,
Llamas, I. 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described
halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*.
Research in Microbiology, 157(9), pp.827–835.
- Mavingui, P., Combes, C., Normand, P., Steinberg, C. 2015. Microorganisms and
Biotic Interactions. In Environmental Microbiology: Fundamentals and
Applications. pp. 395–444.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl
(DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science
and Technology, pp.211–219.
- Morita, R.Y. 1975. Psychrophilic Bacteria1. Microbiology, 39(2), pp.144–167.
- Morita, R.Y., Moyer, C.L. 2001. Psychrophiles, origin of. , 4, pp.917–924.
- Nichols, C.M., Bowman, J.P., Guezennec, J. 2005. Effects of incubation
temperature on growth and production of exopolysaccharides by an antarctic
sea ice bacterium grown in batch culture. Applied and environmental
microbiology, 71(7), pp.3519–3523.
- Nicolaus, B., Kambourova, M., Oner, E.T. 2010. Exopolysaccharides from
extremophiles: from fundamentals to biotechnology. Environmental
technology, 31(10), pp.1145–1158.
- Nicolaus, B., Poli, A., Anzelmo, G. 2010. Bacterial Exopolysaccharides from
Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological
Activities. Marine Drugs. 8: pp.1779- 1802.

- Öner, E. T. 2013. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries . Springer Berlin Heidelberg, pp. 35-56.
- Patel, A., Prajapat, JB. 2013. Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. Advances in Dairy Research, 01(02), pp.1–7.
- Pradesh, U., Vishwavidyalya, R.D. 2012. Isolation and characterization of psychrotolerant *Paenibacillus agaridevorans* strain s26 from subglacial. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 3(2), pp.818–827.
- Prinsen, P. 2010. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas.Universidad de Sevilla.
- Ramana, K. V., Singh, L., Dhaked, R.K. 2000. Biotechnological application of psychrophiles and their habitat to low-temperature. Journal of Scientific and Industrial Research, 59(2), pp.87–101.
- Ramli, A.N.M., Azhar, M., Shamsir, M., Rabu, A., Murad, A., Mahadi, N. M., Illias, R. 2013. Sequence and structural investigation of a novel psychrophilic α -*amylase* from *Glaciozyma antarctica* PI12 for cold-adaptation analysis. Journal of Molecular Modeling, 19(8), pp.3369–3383.
- Ray, M. K., Kumar, G. S., Janiyani, K., Kannan, K., Jagtap, P., Basu, M. K., Shivaji, S.,1998. Adaptation to low temperature and regulation of gene expression in Antarctic psychrotrophic bacteria. Journal of biosciences, 23(4), pp. 423-435.
- Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., Gutnick, D. L. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties. Applied and Environmental Microbiology, 37(3), pp.402–408.

- Salwan, R., Kasana, R.C. 2012. Purification and Characterization of an Extracellular Low Temperature-Active and Alkaline Stable Peptidase from Psychrotrophic *Acinetobacter* sp. MN 12 MTCC (10786). Indian Journal of Microbiology, 53(1), pp.1–7.
- Sánchez, L. A., Sierra, M., Siñeriz, F., Delgado, O. 2013. Andrimid production at low temperature by a psychrotolerant *Serratia proteamaculans* strain. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(10), pp.1773–1781.
- Sengupta, D., Chattopadhyay, M.K., 2013. Metabolism in bacteria at low temperature: A recent report. Journal of Biosciences, 38(2), pp.409–412.
- Sledjeski, D., Gottesman, S. 1995. A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 92: pp.2003-2007.
- Son, H. J., Heo, M. S., Kim, Y. G., Lee, S. J. 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. Biotechnology and applied biochemistry, 33(1), pp.1-5.
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., Reeves, P. R. 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid . Journal of Bacteriology , 178(16), pp.4885–4893.
- Sutherland, I. W., 1993. Xanthan. In *Xanthomonas*. Springer Netherlands, pp.363-388.
- Tarpgaard, I.H., Boetius, A., Finster, K. 2006. *Desulfobacter psychrotolerans* sp. nov., a new psychrotolerant sulfate-reducing bacterium and descriptions of its physiological response to temperature changes. International Journal of General and Molecular Microbiology, 89(1), pp.109–124.

- Toren, A., Orr, E., Paitan, Y., Ron, E. Z., Rosenberg, E. 2002. The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein. *Journal of Bacteriology*, 184(1), pp.165–170.
- Vankranenburg, R., Boels, I., Kleerebezem, M., Devos, W. 1999. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: pp.498-504.
- Wan, H., Yuan, J., Shan, X., Wu, Q., Shi, Nan. 2011. Structure and bio-properties of extracellular polysaccharide from *Bacillus sp.* strain LBP32 Isolated from LUOBOPO desert. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(4), pp.761–768.
- Wang, G.X., Gao, Y., Hu, Bo., Lu, X. L., Liu, X. Y., Jiao, B. H. 2013. A novel cold-adapted β -galactosidase isolated from *Halomonas sp.* S62: Gene cloning, purification and enzymatic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), pp.1473–1480.
- Weininger, S.J., Stermitz, F.R. 1988, Química orgánica. Barcelona, España. Reverte.
- Whitfield, C., Roberts, I.S. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 31: pp.1307-1319.
- Whitfield, C. 2006. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 75: pp.39-68.
- Wu, Z., Kan, F. W.K., She, Y.M., Walker, V.K. 2012. Biofilm, ice recrystallization inhibition and freeze-thaw protection in an epiphyte community. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(4), pp.363–370.

Yamashiro, Y., Sakatoku, A., Tanaka, D., Nakamura, S. 2013. A cold-adapted and organic solvent-tolerant lipase from a psychrotrophic bacterium *Pseudomonas sp.* Strain YY31: Identification, cloning, and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(4), pp.989–1000.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Verónica Alvarado Martínez

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Tesis: EVALUACIÓN DEL EXOPOLISACÁRIDO PRODUCIDO POR UNA BACTERIA PSICROTOLERANTE AISLADA DEL NORESTE DE MÉXICO Y SUS POTENCIALES APLICACIONES INDUSTRIALES.

Edad: 29 años

Campo de estudio: Biotecnología

Biografía:

Datos personales: Nacida en Guanajuato, Guanajuato el 17 de abril de 1986, hija de Miguel Rogelio Alvarado Hernández[†] y Ma. Guadalupe Martínez Rodríguez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Zacatecas, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en el 2010.